



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

KULTIVACE VRSTVY BUNĚK V MIKROFLUIDNÍM SYSTÉMU

CELL LAYER CULTIVATION IN THE MICROFLUIDIC SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ksenia Kachan

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Baiazitova

BRNO 2017

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Ksenia Kachan

ID: 164973

Ročník: 3

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Kultivace vrstvy buněk v mikrofluidním systému

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti kultivace endoteliálních buněk ve 2D a 3D kultivačních zařízeních a v oblasti mikrofluidních systémů simulujících kapiláry. 2) Seznamte se s technikou fluorescenční a konfokální mikroskopie. Prostudujte mikroskopické techniky pro snímání adherentních buněk. 3) Proveďte kultivaci vrstvy buněk v navrhnuté mikrokapiláře. Proveďte testy značení a vizualizaci buněk. 4) Zhodnoťte přežívání buněk a dlouhodobou retenci v daném tvaru. 5) Zpracujte kultivační jamky do mikrofluidního systému a proveďte dané testy. 6) Proveďte sběr mikroskopických dat, analýzu získaných výsledků a jejich diskuzi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] YOUNG, Edmond WK; SIMMONS, Craig A. Macro-and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. Lab on a Chip, 2010, 10.2: 143-160.

[2] ESTRADA, Rosendo, et al. Endothelial cell culture model for replication of physiological profiles of pressure, flow, stretch, and shear stress in vitro. Analytical chemistry, 2011, 83.8: 3170-3177.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 2.6.2017

Vedoucí práce: Larisa Baiazitova

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Teoretická část této práce se zabývá popisem principů kultivace buněk *in vitro* a moderních *in vitro* modelů pro kultivaci endoteliální buněčné vrstvy. V práci jsou dále popsány principy konfokální a fluorescenční mikroskopie. Praktická část je věnována práci s buněčnými kulturami a realizaci experimentu, který spočívá v kultivaci buněčné vrstvy v mikrofluidním systému. Buněčná vrstva byla během experimentu snímána konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem *Leica TCS SP8 X*. Pro zpracování a analýzu pořízených snímků byl navržen algoritmus v programovacím prostředí MATLAB.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kultivace *in vitro*, fibronectin, fluorescence, fluorofory, fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie, *Leica TCS SP8 X*, *Calcein AM*.

ABSTRACT

The theoretical part of this thesis describes the principles of cell culture *in vitro* and modern *in vitro* models for endothelial cell layer cultivation. It also describes the principles of confocal and fluorescence microscopy. The practical part is dedicated to working with cell cultures and realization of experiment with cell cultivation in microfluidic system. Cell layer was photographed using laser confocal scanning microscope *Leica TCS SP8 X* during the entire experiment. For processing and analysis of the obtained images, an algorithm in the software MATLAB was proposed.

KEYWORDS

Cell culture *in vitro*, fibronectin, fluorescence, fluorophores, fluorescence microscopy, confocal microscopy, *Leica TCS SP8 X*, *Calcein AM*.

Kachan, K. *Kultivace vrstvy buněk v mikrofluidním systému*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 47 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Larisa Baiazitova.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Kultivace vrstvy buněk v mikrofluidním systému“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala páni Ing. Larise Baiazitové za odborné vedení mé bakalářské práce, vstřícnost při konzultacích, cenné rady, trpělivost a ochotu, se kterou se mi věnovala v průběhu vypracování bakalářské práce. Zároveň bych ráda poděkovala Mgr. Josefu Skopalíkovi za cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

Úvod	1
1. Kultivace buněk <i>in vitro</i>	2
1.1 Základní principy kultivaci	2
1.2 Endotel	4
1.3 Buněčné linie HUVEC a HEK293	4
1.4 Fibronektin	5
2. Mikroskopie	6
2.1 Fluorescence	6
2.2 Fluorofory	7
2.3 <i>Calcein AM</i>	8
2.4 Fluorescenční mikroskopie	9
2.5 Konfokální mikroskopie	11
2.6 Konfokální laserový skenovací mikroskop <i>Leica TCS SP8 X</i>	12
3. Kultivace v mikrofluidních systémech	14
3.1 <i>In vitro</i> modely pro kultivaci buněk v mikrofluidním systému	14
3.2 Přehled metod zpracování a analýzy mikroskopických dat	17
4. Praktická část	21
4.1 Použité materiály a přístroje	21
4.2 Příprava mikrokapiláry v Petriho misce	23
4.3 Rozmražení buněk	24
4.4 Pasážování buněk	24
4.5 Testy značení a vizualizaci buněk	27
4.6 Testování optických vlastností mikrokapiláry	28
4.7 Kultivace buněčné vrstvy v podmínkách trvalého průtoku	29
4.8 Zpracování a analýza získaných mikroskopických snímků	32
5. Diskuze dosažených výsledků	34
Závěr	37
Seznam literatury	39
Seznam obrázků	44
Seznam příloh na CD	47

Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá tématem kultivace buněčné vrstvy v mikrofluidním systému. Teoretická část práce poskytuje základní informace o endotelu, principech *in vitro* kultivace buněk, *in vitro* modelech pro experimenty s mikrofluidními systémy simulujícími kapiláry. Dále jsou v práci popsány algoritmy a softwarové nástroje pro automatickou analýzu a zpracování mikroskopických snímků pořízených při experimentech s mikrofluidními systémy. Teoretická část se také zabývá popisem jevu fluorescence, který je nezbytný pro pochopení principu fluorescenční mikroskopie. V práci jsou uvedeny informace o fluoroforech, principu konfokální mikroskopie a fluorescenční sondě *Calceinu AM*, která byla použita v praktické části.

In vitro kultivace buněk je nezbytnou metodou vzhledem k jejímu širokému uplatnění v různých vědách a oblastech. Buněčné kultury mají celou řadu využití především v genetice, imunologii, mikrobiologii a medicíně. Zavedení mikrofluidních systémů je významným posunem ve výzkumu cévní biologie, protože umožňuje vytvořit fyziologicky věrohodné modely, připodobňující lidský oběhový systém, pro studium buněk. Experimenty s mikrofluidními systémy poskytují podobné výsledky jako *in vivo* experimenty. Právě kultivace endoteliálních buněk v mikrofluidních systémech umožňuje sledování změn jejich struktury a funkce při působení hemodynamických sil. Sledování reakce endotelu na různé biochemické a biomechanické podněty, vyskytující se v živém organismu, poskytuje základ pro pochopení cévních onemocnění a důležitých procesů závislých na proudění tělních tekutin. Endoteliální buňky mají široké využití při *in vitro* experimentech, zkoumajících imunitní systém lidského organismu, chování buněk při zánětlivých procesech a nádorových onemocněních. [1]

Praktická část této bakalářské práce je zaměřena na popis jednotlivých kroků při práci s buněčnými kulturami. Konkrétně jsou popsány postupy rozmrazování a pasážování buněk a značení endoteliálních buněk fluorescenční sondou *Calceinem AM*. Také je v praktické části popsán experiment, který spočívá v kultivaci buněčné vrstvy v navrhnuté mikrokapiláře a sledování změn buněčné vrstvy vlivem proudění. Během experimentu je buněčná vrstva snímána konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem *Leica TCS SP8 X*. Pro zpracování a analýzu pořízených snímků je navržen algoritmus v programovém prostředí MATLAB.

1. Kultivace buněk *in vitro*

Latinský termín „*in vitro*“ znamená „ve skle“, jedná se o obecné označení pro metody, jejichž cílem je vytvořit stejné podmínky pro buňky ve zkumavce, jako jsou podmínky nacházející se v organismu. *In vitro* kultivace buněk je proces, během kterého jsou odebrané prokaryotické nebo eukaryotické buňky kultivovány za kontrolovaných laboratorních podmínek. V praxi se pojem „kultivace buněk“ vztahuje obvykle k pěstování buněk jednoho typu tkáně, získaného z mnohobuněčného eukaryotického organismu, nejčastěji od živočichů. Výjimečně se jedná také o pěstování dvou nebo více typů buněk současně v jednom prostoru a sledování jejich interakcí, například interakce trombocyt – endotelová buňka, makrofág – nádorová buňka. [2]

1.1 Základní principy kultivaci

Pro *in vitro* kultivaci se živé buňky získávají několika způsoby. Buňky mohou být získány z krve, avšak ze všech krevních elementů mají pouze leukocyty schopnost přežívat dlouhodobě v kultuře. Buňky je možné získat také z měkkých tkání pomocí speciálních enzymů jako trypsin nebo kolagenáza. Při dlouhodobé *in vitro* kultivaci se však vlastnosti někdy vypěstovaných buněk liší od původních buněk tkání, což musí být při biomedicínských nebo farmakologických testech vždy dobře zdokumentováno a bráno v potaz. [2], [3]

Prakticky všechny buňky převedené z živého organismu do *in vitro* kultury stárnou a dříve nebo později ztrácejí schopnost se rozmnožovat, ale mohou si zachovat svou životaschopnost. Existují však imortalizované linie buněk, které mají schopnost nekonečného rozmnožování nebo alespoň schopnost velmi vysokého počtu dělení. K imortalizovaným liniím patří nádorové buňky a laboratorní buněčné linie vznikající transformací buněčných kmenů umělou aktivací genu telomeráza. Nádorové buňky se zpravidla lépe množí, snáze se kultivují a většinou nepodléhají stárnutí na rozdíl od normálních buněk. Z hlediska životnosti se dají rozdělit buněčné kultury do tří skupin:

- Primární kultury (tzv. první kultura) zahrnují buňky čerstvě izolované z organismu.
- Sekundární kulturou nebo subkulturou jsou buněčné kmeny vznikající z primárních kultur, které se v podmínkách *in vitro* začaly rozmnožovat.
- Permanentní buněčné linie mají tendenci k neomezenému rozmnožování. [3], [4], [5]

Buňky lze kultivovat ve stavu suspenzí nebo adherované na vhodném povrchu. Při pěstování adherentní kultury je důležité vytvořit hydrofobní povrch kultivační nádoby. Nejčastěji se dnes používá speciálně ošetřený polystyren. [3]

Buňky se pěstují v speciálním živném roztoku nebo médiu, které se svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi podobá extracelulárním tekutinám in vivo systému. Aby kultivace byla úspěšná, je nutné odebrané buňky přidat co nejrychleji do živného média. Živné roztoky se pro různé kultury buněk liší svým chemickým složením, hodnotou pH, koncentrací glukózy, koncentrací solí a organických živin. Důležitou součástí živného média je fetální bovinní sérum a dostatečné množství živin, které umožňuje rychlý růst buněčných kultur. Sérum v kultivačním roztoku doplňuje velkou řadu biologicky významných organických látek, jako jsou růstové faktory, inhibitory proteáz a některé látky významné pro adhezi buněk. Roztok musí taky obsahovat antibiotika pro snížení rizika kontaminace bakteriemi. Kultivační médium zajišťuje dostatečně rychlou difúzi kyslíku a oxidu uhličitého. [3], [6], [7]

Velký důraz je při kultivaci kladen na přesnou kontrolu teploty prostředí, sterilitu používaných nástrojů a celého prostředí, ve kterém se vzorek přežívá a roste. Pro buňky savců, včetně lidských, je navíc nutné přizpůsobit kultivační atmosféru. Zpravidla se při kultivaci savčích buněk reguluje relativní vlhkost a někdy i koncentrace kyslíku. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého je nutná na udržení pH média často společně s bikarbonátovým pufrem. Inkubátor tedy musí umožňovat snadné čištění a sterilizaci povrchu. Některé inkubátory používané pro práci s buněčnými kulturami jsou vybaveny i ultrafialovou lampou nebo vysokoteplotní autosterilizací, které riziko kontaminace inkubátoru snižuje. [3]

Z důvodu stálého dělení občas vzniká přebytek buněk během pěstování, což vede k různým komplikacím. Přebytek buněk v kultuře může způsobit nahromadění toxických výměšků a mrtvých buněk v živném médiu. V důsledku toho může začít buněčná diferenciace. Nahromadění buněk má negativní vliv na buněčný cyklus a ve výsledku se růst a dělení zpomaluje, buňky stárnou, potažmo hynou. Pro udržování normálního stavu buněčných kultur, tedy pro zabránění negativním jevům, se pravidelně mění médium a provádí se pasážování buněk. Pasáž buněk je pracovní postup, během kterého dochází k uvolnění

adherentních buněk od kultivačního povrchu i od sebe navzájem a umístění buněk v nižší koncentraci do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. [3], [6], [7]

1.2 Endotel

Endotel představuje jednu vrstvu epiteliálních buněk, která vystýlá vnitřní povrch srdeční dutiny, krevních i lymfatických cév, kryje srdeční chlopně a řadu tělesných dutin. Endotel je tvořen pevně spojenými plochými buňkami a v souhrnu dosahuje v lidském těle hmotnosti 1-1,5 kg, přičemž pokrývá plochu přibližně 700 m².

Endotel je nejen bariérou oddělující krev od okolních tkání, ale i filtrem. Je to největší, v těle dynamický a heterogenní orgán, vyskytující se v cévách všech orgánových systémů. Endoteliální buněčná struktura hraje důležitou roli v udržování krevních funkcí a integrity cévního řečiště. Endoteliální buňky vylučují substance nezbytné pro kontrolu srážení krve, regulaci cévního tonu a arteriálního krevního tlaku, normální plnění filtračních funkcí ledvin a aktivitu srdce. V lidském těle endotel plní metabolické, sekreční a syntetické funkce, jako je vazokonstrikce a vazodilatace, angiogeneze a regulace protrombinu i fibrinu. Hraje důležitou roli při řízení hemostázy a ovlivňuje fibrinolýzu. Endotel vykonává mimo jiné významnou obrannou imunitní funkci při zánětlivých procesech. [8], [9]

1.3 Buněčné linie HUVEC a HEK293

V praktické části této bakalářské práce byly využity buněčné linie HUVEC a HEK293. Buňky linie HUVEC jsou lidské endoteliální buňky odvozené z pupečnickové žíly. Mají své široké uplatnění v různých studiích, kvůli jejich poměrně nízké ceně a snadné izolaci z lidské pupečnickové žíly. Používají se pro zkoumání funkcí a patologií endoteliálních buněk a při studiu rolí endotelu v odpovědi cévní stěny na třecí sílu, kterou na jejich povrchu vytváří proudící krev. Buněčná linie HUVEC je velmi často používána v experimentech s mikrofluidními systémy a v různých farmakologických a farmakokinetických studiích, které jsou zaměřeny na zkoumání normální, abnormální a tumorové angiogeneze, procesu srážení krve, oxidačního stresu, hypoxie a fibrinolýzy. [10], [11]

Buněčná linie HEK293 je izolována z ledviny zdravého lidského embrya. Buňky HEK293 poprvé izoloval v 70. letech vědec Alex Van der Eb v Holandsku. Tato buněčná linie má své široké uplatnění v biomedicinském výzkumu, díky její snadné kultivaci,

schopnosti rychlého dělení a transfekci. Používá se často při experimentech, kde vlastnosti a chování buňky samotné není předmětem zájmu, například za účelem zkoumání účinků léku na sodíkové kanály a interakce mezi dvěma proteiny. Dále se buňky této linie využívají ve farmakologických studiích v roli producentů terapeutických bílkovin a virů v genové terapii. [12], [13]

1.4 Fibronektin

Adhezní faktor fibronektin, popsáný v této kapitole, usnadňuje přichycování buněk a bílkovin ke tvrdým povrchům. Normální vývoj buněčných kultur je podmíněn adhezními faktory a komponenty extracelulárního matrixu, avšak některé buněčné kultury nejsou schopné syntetizovat dané komponenty. Proto vzniká potřeba dodatečného zdroje. V praktické části této bakalářské práce byl použit přirozený polymer fibronektin, ke zlepšení adheze buněčné vrstvy, která byla kultivována na povrchu chemického silikonu PDMS. [14]

Název fibronektinu pochází z latinského „*fibra*“, což znamená „vlákno“ a „*nectere*“, což znamená „spojení“. Fibronektin je multifunkčním glykoproteinem extracelulárního matrixu, který se skládá ze dvou téměř identických polypeptidů. Buněčný fibronektin se strukturně a antigenně podobá „studenému“, nerozpustnému globulinu v krevní plazmě. Molekula fibronektinu obsahuje několik funkčně a strukturně odlišných domén, které se vážou na buněčné povrchy, kolagen, fibrinogen, fibrin a heparin. Fibronektin se používá jako adhezní faktor, zlepšující adhezi „náročných“ buněčných kultur, kterým k růstu nepostačuje standardní hydrofobní polystyren. Také bylo prokázáno, že se fibronektin účastní regulace buněčných funkcí jako například buněčná adheze, migrace, růst a diferenciace. Buněčný fibronektin je sekretován epiteliálními a mezenchymálními kmenovými buňkami – fibroblasty, chondrocyty, myoblasty, makrofágy, hepatocyty a střevními epiteliálními buňkami. Vyskytuje se v mnoha tkáních včetně sleziny, mandlí, krevních cév, jater, ledvin atd. [15]

2. Mikroskopie

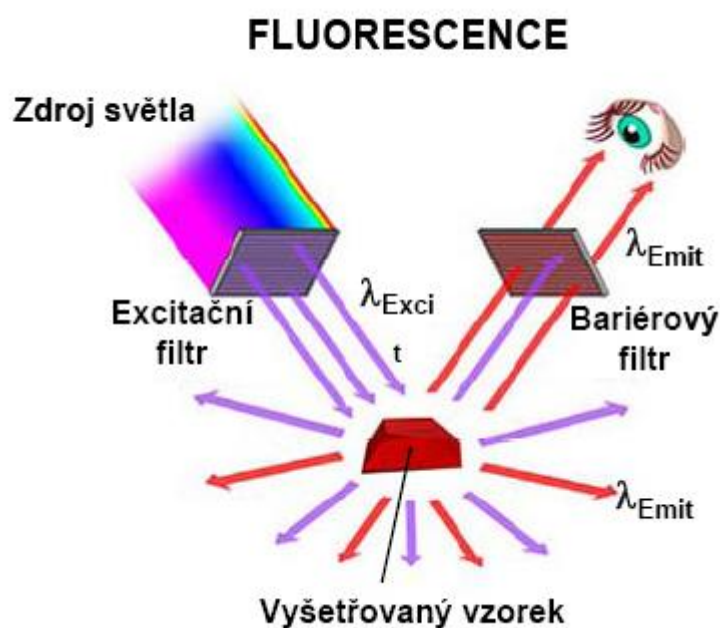
Lidské oko má rozlišovací schopnost jedné úhlové minuty, která odpovídá, při pozorování z konvenční zrakové vzdálenosti, bodům vzdálených od sebe zhruba 0,07 mm. Takové rozlišení je však pro studium buněčné a podbuněčné struktury živé hmoty nedostatečné. První mikroskop, umožňující studium buněk, vznikl koncem 16. století v Holandsku. V roce 1650 byl mikroskop zdokonalen Anthony van Leeuwenhoekem, který byl průkopníkem mikroskopie a prvním člověkem schopným spatřit krevní kapiláry a jiné biologické mikrostruktury. Díky dalšímu pokroku ve zdokonalení mikroskopie se rozlišovací schopnost mikroskopů dostala na úroveň molekul a atomů. Pod pojmem „mikroskop“ rozumíme optický přístroj určený k zobrazení objektu, které nejsou viditelně pouhým okem. [16]

2.1 Fluorescence

Atomy se mohou nacházet v základním energetickém stavu nebo ve stavech excitovaných. Pro základní energetický stav je charakteristická minimální hodnota energie elektronů na rozdíl od excitovaného stavu, kdy jeden nebo více elektronů mají vyšší energetické hladiny. Excitovaný stav atomu není stálý, při přeskočení elektronu zpět na původní hladinu nastane deexcitace, přičemž se rozdíl energií vyzáří ve formě fotonu elektromagnetického záření. Extrémním případem excitace atomu je stav ionizace, při kterém vznikají ionty, tedy elektricky nabitě částice z původně elektricky neutrálních atomů či molekul. Atom se nachází ve stavu excitace nebo ionizace velmi krátkou dobu (10^{-8} až 10^{-5} s). Některé excitované stavy jsou označovány jako metastabilní. Metastabilní stav je charakteristický svou vysokou stabilitou a atom může v tomto stavu setrvat minuty až hodiny. [16], [17]

Elektromagnetické záření, vznikající při přechodu atomu z metastabilního do základního stavu, je označováno jako luminiscence. Pokud metastabilní stav trvá krátkou dobu jedná se o fluorescenci. Trvá-li delší dobu, hovoříme obvykle o fosforescenci. Rozdíl mezi fosforescencí a fluorescencí spočívá v typu energetického přechodu. Při fluorescenci nastává excitace samovolnými přechody na rozdíl od fosforescence, kde se při excitaci uplatňuje metastabilní hladina, která způsobuje prodloužení emise. [16], [17]

Fluorescence je fyzikálně chemický děj, který je společně s fosforescencí typ luminiscence. Fluorescence spočívá ve vlastnostech určitých chemických látek (fluoroforů), které jsou po excitaci světlem schopny absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o delší vlnové délce. Využití jevu fluorescence je základem fluorescenční mikroskopie. Princip optických přístrojů založených na fluorescenčním jevu je demonstrován na obrázku (viz Obrázek 1). [16], [17]



Obrázek 1: Princip optických přístrojů založených na fluorescenci. Převzato z [18]

2.2 Fluorofory

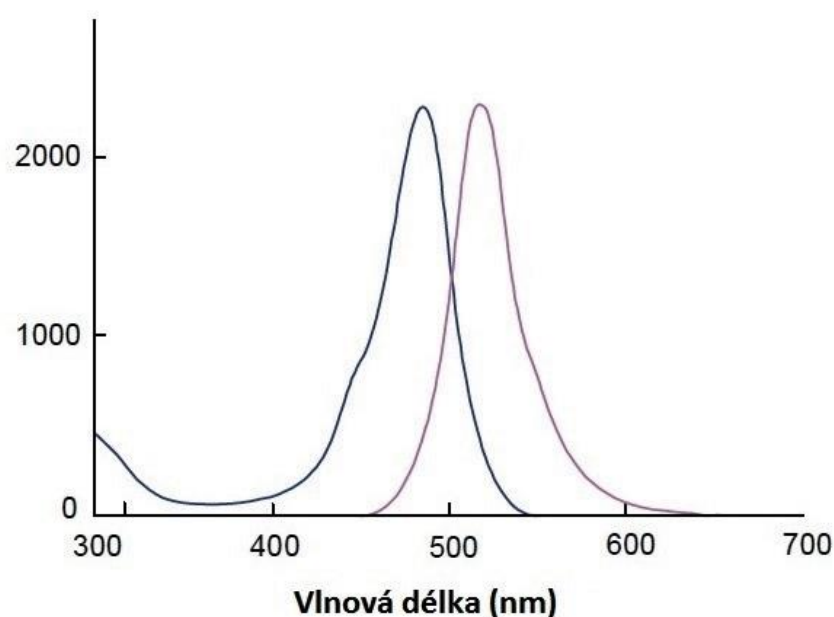
Fluorofory jsou jakékoliv látky, které po ozáření elektromagnetickým vlněním o určité vlnové délce ve viditelné nebo UV oblasti spektra, jsou schopny světlo vyzářit do okolí. Fluorofory můžeme rozdělit do dvou obecných tříd:

- Vnitřní fluorofory — jedná se o vlastní fluorescenci. Vyskytují se v buňkách přirozeně. Do této třídy patří proteiny, vitamin A, redukované formy NADH a NADPH, cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin či chlorofyl.
- Vnější fluorofory — jedná se o nevlastní fluorescenci. Tyto fluorofory se v buňkách přirozeně nevyskytují a přidávají se ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti. [19], [20]

Vnější fluorofory jsou používány v konfokální a fluorescenční mikroskopii. Podle typu vazby rozlišujeme fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Pokud se fluorofor váže na vzorek kovalentně, hovoříme o fluorescenčních značkách. V případě nekovalentní vazby jde o fluorescenční sondu. Fluorescenční značky jsou vnější fluorofory, které se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, rovněž mají široké uplatnění v imunologii, histochemii, afinitní chromatografii. Příkladem rozšířených fluorescenčních značek jsou FITC a TRITC, které se používají v imunofluorescenčních metodách. Vnější fluorofory, které se obvykle používají ke studiu bílkovin nebo vlastností membrán, jsou fluorescenční sondy. Při vazbě na sledovaný vzorek mohou fluorescenční sondy měnit své fluorescenční vlastnosti. Ve fluorescenční spektroskopii je důležitým krokem správná volba fluorescenční sondy, protože právě její vlastnosti umožňují dosáhnout požadovaného cíle experimentu. [19], [20]

2.3 *Calcein AM*

Calcein-acetoxymetyl ester (*Calcein-AM*) je za standardních podmínek nefluorescenční sloučenina, která se v živé buňce enzymaticky rozštěpuje na fluorescenční *Calcein* zelené barvy. *Calcein AM* má široké uplatnění ve fluorescenční mikroskopii a fluorescenční spektroskopii. Díky své schopnosti snadně pronikat přes membránu buňky se používá za účelem krátkodobého označení buněk a jako indikátor viability buňky. Jeho velkou výhodou je, že není toxický. Intenzita *Calceinu* však po několika hodinách poměrně rapidně klesá a na dlouhodobé časosběrné analýzy toto barvivo není vhodné. Maximální fluorescence nastává pro excitační vlnovou délku 495 nm a emisní vlnovou délku 515 nm (viz Obrázek 2). [19], [21]



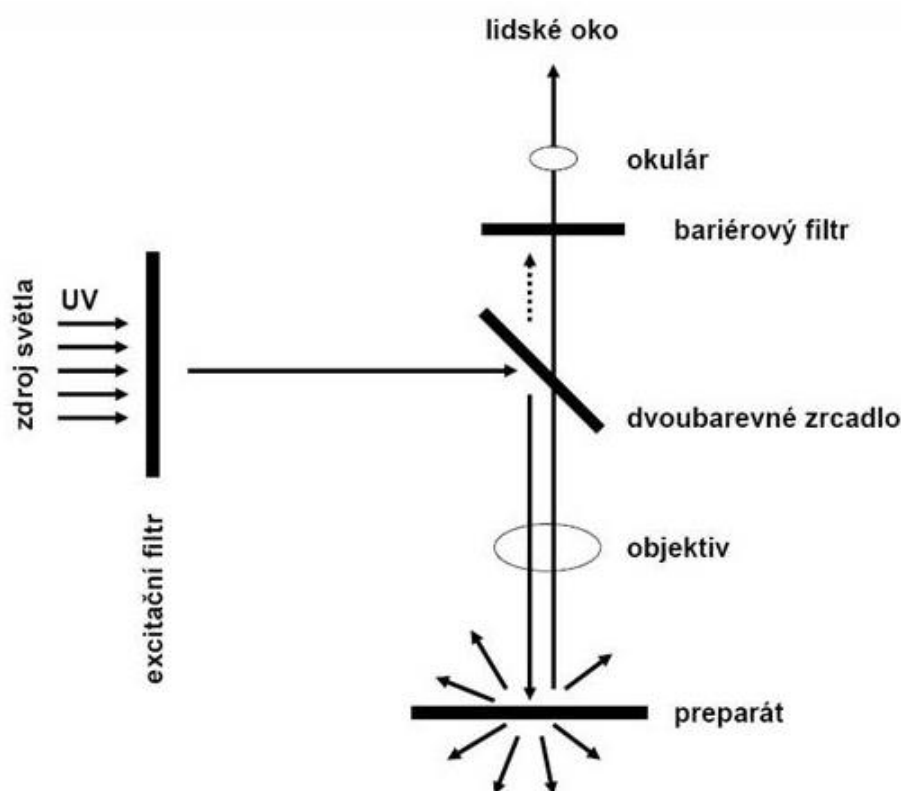
Obrázek 2: Fluorescenční spektra *Calceinu*. Převzato z [22]

2.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je významným nástrojem jak v biologii, tak v oblasti biomedicinských věd a v medicíně. Důvodem jsou její vlastnosti, které nemohou být dosaženy v klasické optické mikroskopii. Velkou výhodou fluorescenční mikroskopie je její vysoká citlivost díky vysokému kontrastu buněk vůči pozadí. Fluorescenční mikroskopy umožňují pozorovat buněčné struktury často při velmi malých koncentracích a při použití fluorescenčních barviv lze selektivně zviditelnit složky cytoskeletu, chromatin nebo membránové bílkoviny. [23], [24]

Fluorescenční mikroskop využívá schopnost některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce. Základními částmi fluorescenčního mikroskopu jsou silný zdroj světla, excitační a bariérový filtr, objektiv a okulár (viz Obrázek 3). Jako zdroj světla ve fluorescenčních mikroskopech se používají vysokotlaké rtuťové výbojky, xenonové výbojky nebo halogenové žárovky. Rtuťová výbojka je trubice z křemenného skla, která obsahuje malé množství inertního plynu a rtuti. Klasické výbojky vyzáří největší množství světelné energie v UV oblasti nebo v oblasti modrých až červených vlnových délek (500–700 nm) a vzhledem k tomu je vždy vybrán určitý typ výbojky k excitaci barviv s daným excitačním maximem.

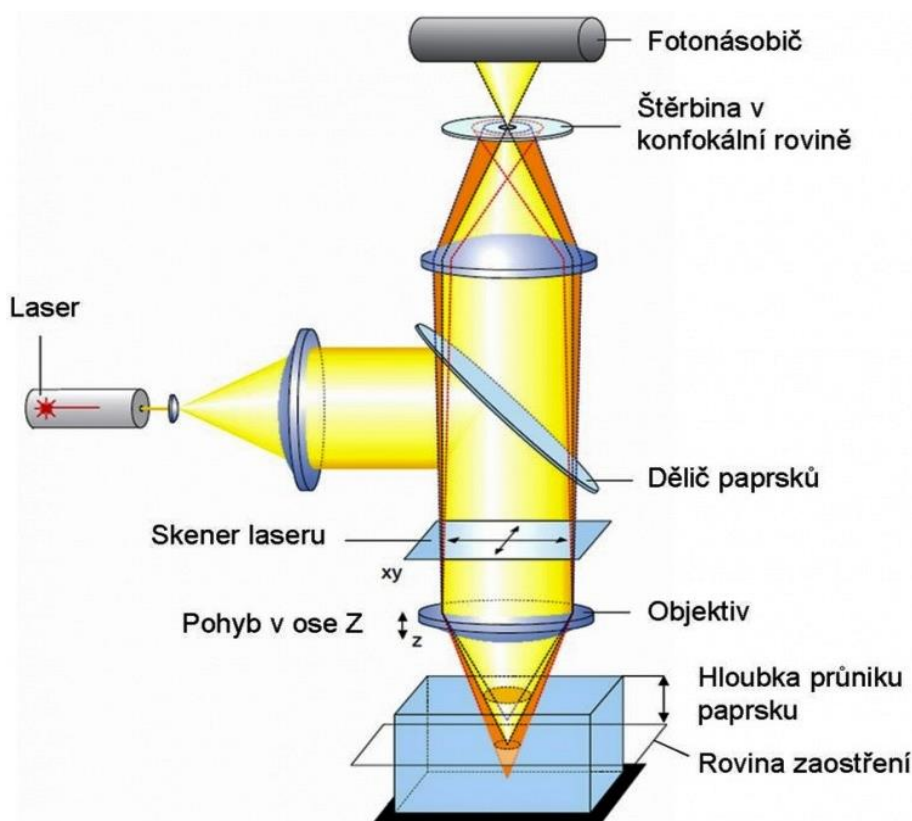
Světelný zdroj emituje světlo s vlnovými délkami v rozmezí od ultrafialové po infračervenou oblast spektra. Světlo ze zdroje prochází excitačním filtrem a dopadá na dvoubarevné nebo dichroické zrcadlo, umístěné pod úhlem 45°. Excitační filtr je umístěn mezi zdrojem světla a vzorkem. Filtr slouží k filtraci světla tak, aby propouštěl pouze světlo, které je potřebné k fluorescenci vzorku (v intervalu vlnových délek od 356 nm do 546 nm). Dichroické zrcadlo pak odděluje excitační a fluorescenční světlo. Poté světlo prochází objektivem a dopadá na preparát se vzorkem, kde dochází k excitaci elektronů. Při návratu elektronů do jejich původního stavu dochází k vyzáření přebytečné energie. Emitované fluorescenční záření má většinou delší vlnovou délku než excitační světlo a šíří se všemi směry. Třetím a posledním filtrem v soustavě fluorescenčního mikroskopu je bariérový filtr, který se nachází mezi vzorkem a okulárem. Tento filtr vytváří černé pozadí k fluorescenčnímu obrazu pro vyšší citlivost tím, že nechává proniknout jen tu část spektra, která představuje požadovaný signál a propouští jen záření o určité vlnové délce (podle použitého fluorochromu). Do okuláru se pak dostane pouze odfiltrované záření. [23], [24]



Obrázek 3: Schéma konstrukce fluorescenčního mikroskopu. Převzato z [25]

2.5 Konfokální mikroskopie

Charakteristickými vlastnostmi konfokální mikroskopie jsou vyšší kontrast, vynikající rozlišení a velký rozsah zvětšení na rozdíl od ostatních metod světelné mikroskopie. Ke znázornění principu funkce konfokálního mikroskopu slouží obrázek (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma konstrukce konfokálního mikroskopu. Převzato z [26]

Princip konfokální mikroskopie spočívá v získání výstupního digitálního obrazu rastrováním pozorovaného preparátu v živém čase bod po bodu a v detekci emitovaného světla detektorem, což je časově náročná metoda, protože každý bod preparátu musí být ozářen určitou dobu. Použití laseru jako intenzivního zdroje světla zajišťuje vyřešení zmíněného problému. Laserový paprsek se pohybuje po preparátu a tím registruje jednu vrstvu pozorovaného objektu, na kterou je zaostřeno. Posun paprsku po preparátu je řízen počítačem, který sbírá informace o každém snímaném bodě a ukládá je do správného místa paměti. Při použití automatického posunu zaostření na hlubší vrstvy je možné skenovat několik desítek či stovek vrstev preparátu a při použití vhodného programu pro zpracování obrázků může být složen výsledný obraz pozorovaného objektu, tak že dojde k překrytí jednotlivých vrstev. Pomocí konfokálního mikroskopu je umožněna rekonstrukce 3D

zobrazení snímaného vzorku. V současné době jsou známy dva typy konfokálního mikroskopu:

- Rastrující konfokální mikroskop — obsahuje skenovací zařízení, které zařizuje posun ohniska excitujícího laserového paprsku.
- Konfokální mikroskop s rotujícím diskem — je rychlejší varianta fungující na principu Nipkowova kotouče.

Laserový řádkovací konfokální mikroskop většinou pracuje s odraženým světlem a s fluorescenčním zářením. Laserový paprsek vychází z bodového zdroje světla, který je fokusován skrz první konfokální clonku na dichromatické zrcadlo a následně objektivem nasměrován na určitý bod sledovaného vzorku. Emitované světlo pak prochází stejným objektivem a děličem paprsků je usměrněno na citlivý detektor světla, fotonásobič. Tomu je předsazena druhá konfokální clonka, která blokuje dopadající záření z oblasti mimo ohniskovou rovinu. Výsledný signál je získán rastrováním a následně zpracován počítačem. [24], [27], [28]

2.6 Konfokální laserový skenovací mikroskop *Leica TCS SP8 X*

Za účelem sledování kultivované buněčné vrstvy v praktické části této bakalářské práce, byl použit konfokální laserový skenovací mikroskop *Leica TCS SP8 X*. Zkoumání buněčných struktur a buněčného pohybu obyčejnou fluorescenční mikroskopií je velmi obtížné, protože se ztrácejí struktury o velikostech menších než 200 nm. Použitím konfokálního mikroskopu *Leica TCS SP8 X* je získán obraz s podstatně lepším rozlišením a vyšším kontrastem. Použitý mikroskop je jedním z nejdokonalejších konfokálních mikroskopů, který má kromě vynikajícího rozlišení a vyššího kontrastu, celou řadu dalších výhod, jako například vysokou rychlost snímání a optimální účinnost. Pro citlivou detekci je zde použit vysokorychlostní snímací systém, který je schopen pořídit kolem 428 obrazů za 1 sekundu. Daný mikroskop využívá jako zdroj bílého světla pulzní laser, umožňující nastavení až 200 vlnových délek v rozsahu od 470 nm do 670 nm a použití 8 vlnových délek současně. Všechny optické komponenty mikroskopu jsou přizpůsobeny k maximálnímu zachování fluorescence a viability buněčných struktur během snímání. [29], [30]



Obrázek 5: Konfokální laserový skenovací mikroskop *Leica TCS SP8 X* s kompletním vybavením.
Převzato z [29]

3. Kultivace v mikrofluidních systémech

V dnešní době mají endoteliální buňky své uplatnění v různých studiích, zaměřených na pochopení její fyziologie a funkce. V této části bakalářské práce jsou představeny moderní modely pro kultivaci endoteliálních buněk a některé metody použité pro zpracování a analýzu mikroskopických snímků pořízených v průběhu experimentů s mikrofluidními systémy.

3.1 *In vitro* modely pro kultivaci buněk v mikrofluidním systému

V závislosti na cíli experimentu mohou být endoteliální buňky kultivované v různých systémech. Buňky se běžně pěstují například v Petriho miskách, ve skleněných či plastových lahvích a v komerčně dostupných variantech, příkladem je μ -Slide od výrobce Ibidi (viz Obrázek 6). μ -Slide umožňuje kultivaci buněk za proudových podmínek se snadným připojením k pumpě, například za účelem studia aterosklerózy. Experimenty s mikrofluidními systémy umožňují vytvoření dostatečně kompletního mikroprostředí pro buněčné kultury, obdobné oběhovému systému živého organismu, díky čemuž odpadá potřeba *in vivo* experimentů. [1], [31]

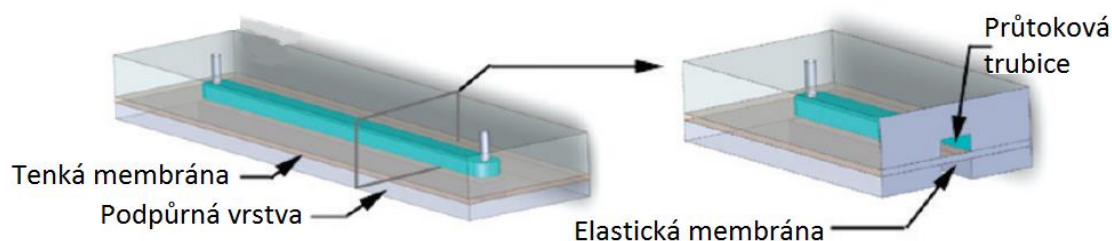
V případech, kdy jsou komerčně nabízené systémy pro kultivaci buněk nedokonalé pro určitý cíl experimentu, vzniká nutnost vytvoření *in vitro* modelu vlastní výroby. Takové případy jsou dále zkoumány a popsány některými nadstandardními *in vitro* modely.



Obrázek 6: μ -Slide I Luer Family. Převzato z [31]

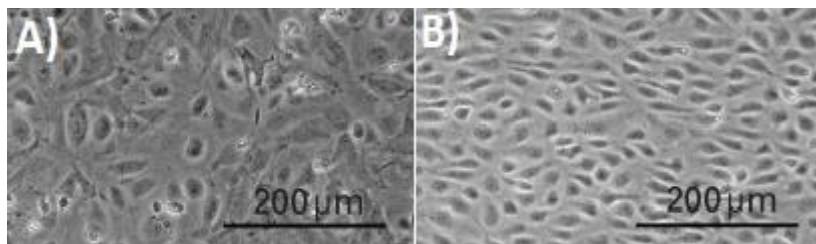
Endothelial Cell Culture Model (ECCM)

Prvním příkladem nadstandartního modelu je „Model endoteliální buněčné kultury (ECCM)“ pro kultivaci buněk v reálných podmínkách při mechanickém zatížení proudící tekutinou. ECCM simuluje podmínky vyskytující se v lidské cévní soustavě. Model se skládá z peristaltické pumpy, pulzační komory, jednostranného ventilu, elementů pro regulaci zatížení a kultivační komory, která obsahuje tenkou, cévám podobnou membránu. Pro experimenty s ECCM byla využita buněčná linie HAEC (**H**uman **A**ortic **E**ndothelial **C**ells). Schematické znázornění kultivační komory je na obrázku (viz Obrázek 7). Endoteliální buňky byli kultivovány na tenké membráně (viz Obrázek 7). ECCM byl použit za účelem simulace normálních a patologických stavu a sledování změn fenotypu endotelu v cévách.



Obrázek 7: Schéma kultivační komory. Převzato z [32]

Změny endoteliální vrstvy vznikly vlivem takzvaného smykového napětí („shear stress“) při průtoku tekutiny systémem. Smykové napětí je definováno jako síla působící na jednotku plochy a může být považováno za tlak, třecí smyk na buněčném povrchu a tahové nebo vyrovnávací síly působící proti externě použitým silám. Jeho jednotkou v soustavě SI je Pascal (Pa), v kardiovaskulárním systému se však používá jednotka dyn/cm^2 . Toto napětí určuje velikost cévy a ovlivňuje její tvarování. Endoteliální buňky pěstované za proudových podmínek (viz Obrázek 8) vnímají třecí sílu, kterou na jejich povrchu vytváří proudící médium, což ovlivňuje genovou expresi v endotelových buňkách a jejich fenotyp. Zejména se jedná o jejich prodlužování a změnu orientace ve směru proudění. Smykové napětí má vliv i na mechanické vlastnosti endoteliální vrstvy, například na viskozitu a pevnost endotelových buněk. Velikost smykového napětí je závislá na rychlosti a viskozitě proudící tekutiny. [1], [32]

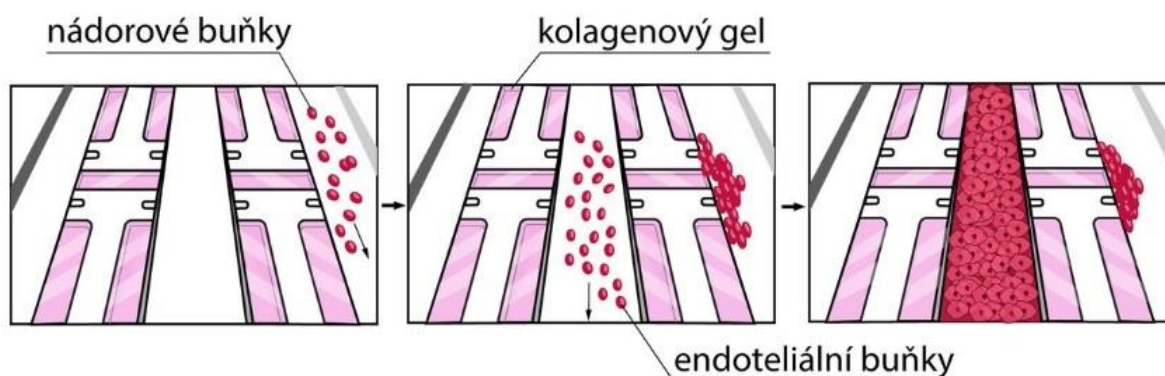


Obrázek 8: Mikroskopické snímky kultivované buněčné kultury HUVEC: A) za normálních podmínek, B) za proudových podmínek. Převzato z [31]

Model onemocnění

V současné době jsou mikrofluidní *in vitro* modely široce využívány za účelem pochopení patofyziologických přeměn endoteliální vrstvy, aktivace endotelové vrstvy, exprese různých proteinů na povrchu a interakce endotelu s okolím při různých onemocněních, například rakovině. Za pomoci mikrofluidních *in vitro* modelů je možné simulovat různé fluidní prostředí uvnitř cév i mikroprostředí, které se vyskytuje v okolí tumoru, a tím zdokonalit diagnostiku počátečních stadií nemoci a získat představu o důležitých procesech choroby.

Příkladem je jeden z mnoha publikovaných, *in vitro* model onemocnění (viz Obrázek 9), který se skládá ze dvou vrstev PDMS, které jsou oddělené tenkou, porézní, polyesterovou membránou. Tímto modelem je realizována společná kultivace endoteliálních a nádorových buněk ve dvou trubicích jednoho modelu. Trubice, ve kterých buňky se kultivují, jsou spojené mezi sebou kanály naplněnými 3D kolagenovým gelem. Použitím tohoto modelu je dokázáno, že stimulace endotelu cytokinem CXCL12 významně zvyšuje adhezi nádorových buněk. [33]



Obrázek 9: Model onemocnění. Převzato z [33]

3.2 Přehled metod zpracování a analýzy mikroskopických dat

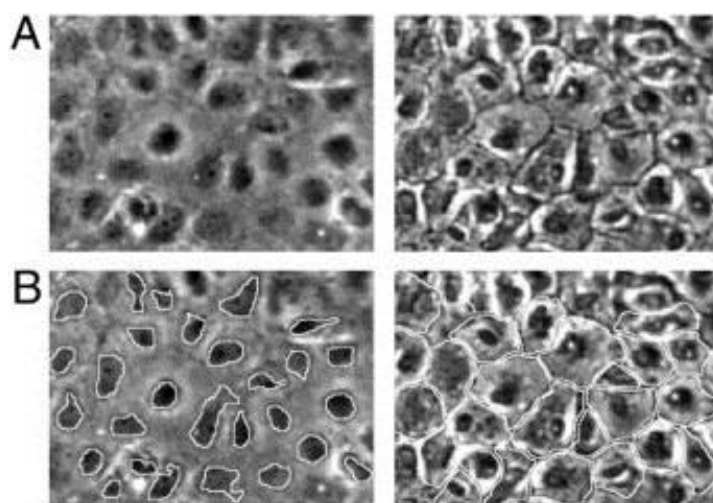
Během experimentů s buněčnými kulturami v mikrofluidních systémech je potřeba, aby byly buňky po celou dobu sledovány mikroskopem za účelem trvalé kontroly stavu buněk a změn kultivované vrstvy, vznikajících vlivem proudění. Snímky buněčné vrstvy, získané v průběhu experimentu (obvykle po určitých časových intervalech), musí být dále vhodným způsobem analyzovány, aby bylo možné popsat chování buněk za určitých podmínek. Změna směrovosti buněk a jejich prodloužení ve směru proudu jsou adaptačními procesy endoteliálních buněk, za účelem zmenšení mechanického zatížení a obrany proti hydrodynamickému poškození. Z toho důvodu jsou významnými analyzovanými parametry, při experimentech s mikrofluidními systémy, směrovost a změna tvaru buněk. Také je možná detekce důležitých buněčných struktur, jako například buněčné jádro nebo buněčná spojení, protože smykové napětí v buňkách vyvolává translokaci buněčných organel a reorganizaci mikrofilament. Na základě toho, detekce morfologických změn buněk vždy vyžaduje detailní a kvantitativní analýzu, za účelem získání objektivních výsledků. Tudíž je zapotřebí realizovat experimentální systém, který umožní zautomatizovat sběr dat, jejich zpracování a analýzu. Dále jsou popsány některé algoritmy pro analýzu výsledků experimentů s mikrofluidními systémy. [34]

1. Předložený algoritmus pro zpracování mikroskopických snímků (viz Obrázek 10) byl realizován v programovacím prostředí LabVIEW za využití modulu IMAQ, který umožňuje získávání obrazu z kamery či souboru, jeho zpracování a analýzu. Mikroskopické snímky byly pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem v minutových intervalech po dobu 60 minut. Během experimentu byla prozkoumána odpověď buněčné vrstvy na proudící tekutinu, především změna uspořádání a tvaru buněk. Sledováním buněčné vrstvy v reálném čase bylo prokázáno, že endoteliální buňky reagují a přizpůsobují se stresovým podmínkám.



Obrázek 10: Schéma algoritmu použitého pro zpracování sady mikroskopických snímků v programovacím prostředí LabVIEW. Získanými parametry buněk jsou: pozice (x, y), velikost plochy, směrovost, perimetr atd., v určitém časovém okamžiku. Převzato z [34]

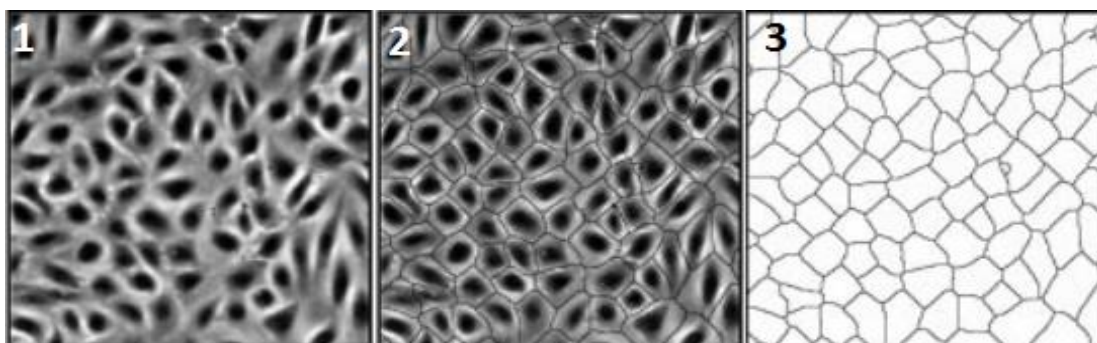
Algoritmus provádí úpravu kontrastu a jasu získaného obrazu, morfologické operace odstraňují malé částice a buňky, které se dotýkají hran obrazu. Ačkoliv existují složitější metody zpracování mikroskopických snímků, předložený algoritmus prokázal svou spolehlivost a efektivitu. Zpracování jednoho snímku danou metodou trvá přibližně 5 sekund na standardním počítači. Daný algoritmus je schopen vypočítat široké spektrum parametrů, které umožňují diferencovat a kvantitativně analyzovat buněčné změny. Algoritmus mimo jiné detekuje a zviditelňuje buněčné jádro a většinu vedlejších buněčných organel (Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum). Získaná sada zpracovaných obrazů může být dále použita k výpočtu složitějších parametrů, jako jsou korelační funkce a parametry buněčné pohyblivosti. [34]



Obrázek 11: Snímky pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem (A) byly zpracovány pomocí algoritmu z Obrázku 10. Výsledné snímky (B) byly použity pro výpočet a porovnání orientace buněk. Převzato z [34]

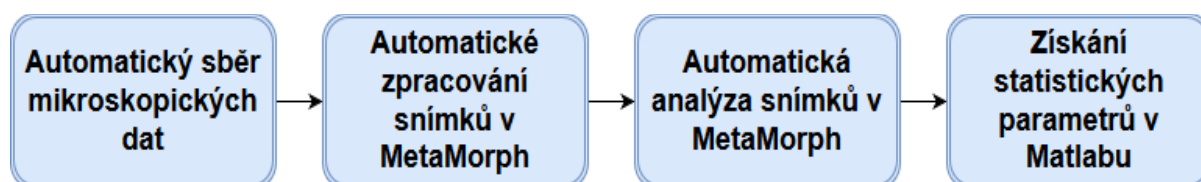
2. V dalším příkladu, zaměřeném na sledování změn buněčné vrstvy, byl ke zpracování snímků použit software MetaMorph (Molecular Devices), který byl vyroben pro automatickou analýzu mikroskopem získaných dat. Software nabízí uživateli množství modulů pro biologickou analýzu, jako jsou například buněčná signalizace nebo počítání množství buněk. Mikroskopické snímky endoteliální vrstvy byly pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem každé 2 minuty po dobu 96 hodin, za využití automatického systému pro sběr digitálních obrazů řízeného softwarem MetaMorph. Snímky se ukládaly v autonomním režimu pro jejich následnou analýzu a zpracování. Pro zlepšení kontrastu a

zvýraznění buněčných hran byla použita série filtrů softwaru MetaMorph, díky čemuž byl na základě rozdílu fázového kontrastu získán obraz obsahující pouze kontury buněk (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Automatické zpracování a analýza obrazu v MetaMorph. 1) Původní snímek, 2) Průběžný snímek, 3) Výsledný snímek zobrazující kontury endoteliálních buněk. Převzato z [35]

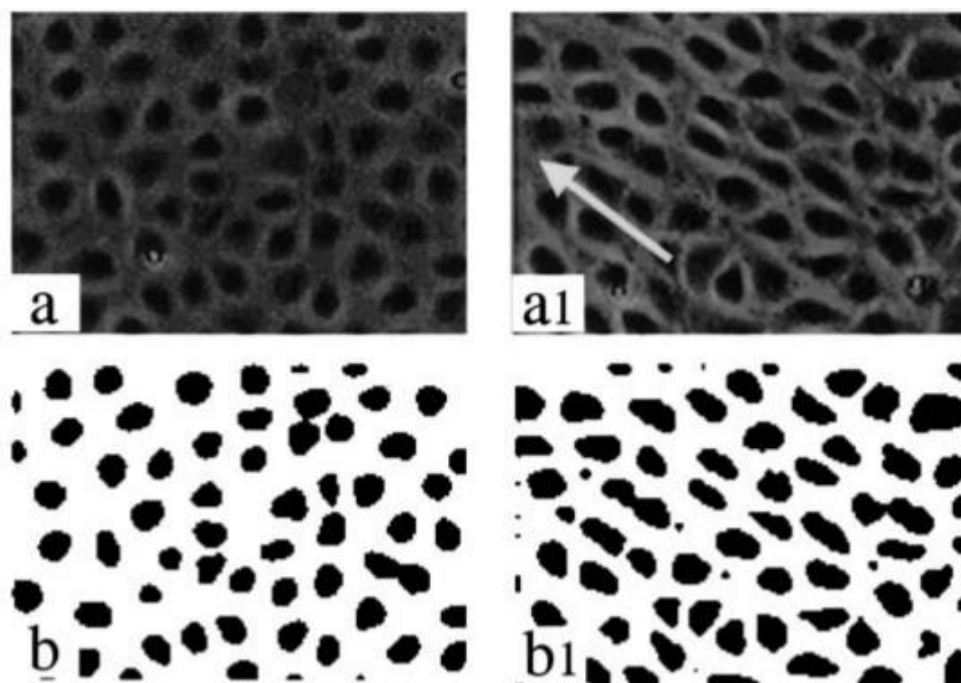
Každý mikroskopický snímek byl zpracován stejným způsobem a následně bylo jednotlivým konturám každé buňky na každém snímku přiděleno číslo objektu. Sekvence automaticky zpracovaných snímků (2880 obrazů) byla porovnána s původním snímkem, díky čemuž bylo možné vysledovat postupné změny každé buňky. Sledování posunu a morfologických změn buněčné vrstvy v závislosti na čase a výpočet vzdálenosti mezi buňkami byly poté realizovány v programovacím prostředí MATLAB. [35], [36]



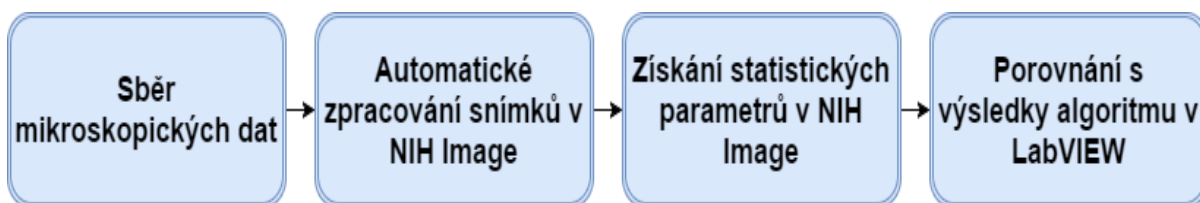
Obrázek 13: Schéma algoritmu použitého při zpracování a analýze sady mikroskopických snímků.

3. Avšak výše popsany software, MetaMorph, není jediným softwarovým nástrojem pro automatickou analýzu a zpracování biomedicínských obrazů. Mezi další programy zabývající se zpracováním obrazu v oblasti optické mikroskopie patří NIH Image. Tento software pro zpracování a analýzu mikroskopických dat je určen pro uživatele operačního systému Mac OS. Program je schopen vytvořit histogram hustoty a nakreslit profilový graf, provést úpravu kontrastu a ostrosti obrazu, vyhlazovací a mediánovou filtraci, detekci okrajů a mnoho dalších operací. Daný software byl použit ke zpracování mikroskopických snímků při experimentu

s endoteliálními buňkami v mikrofluidním systému. Snímky byly získány fluorescenčním mikroskopem, doba snímání byla 210 minut. V programu NIH Image bylo, využitím několika procedur filtrace, provedeno vyhlazování snímků, za účelem zbavení se šumu v pozadí. Dále byla určena vzdálenost mezi buňkami, orientace a celkový počet buněk. Elementy, dotýkající se okrajů snímků, byly automaticky vyloučeny z obrazové analýzy. Jako alternativa k automatickému zpracování v NIH Image byly získané snímky ještě analyzovány pomocí algoritmu v LabVIEW, který byl již popsán v bodě 1. Tento algoritmus poskytl stejné výsledky jako software NIH Image. Analýze bylo podrobena okolo 1500 buněk a každý experiment byl zopakován třikrát. [37], [38]



Obrázek 14: Buněčná vrstva před (a) a po zahájení experimentu v mikrofluidním systému (a1).
Obrázky b a b1 jsou zpracované snímky v programu NIH Image. Převzato z [38]



Obrázek 15: Schéma algoritmu použitého při zpracování a analýze sady mikroskopických snímků.

4. Praktická část

Náplní praktické části této bakalářské práce byla *in vitro* kultivace buněčné vrstvy v navrhnuté mikrokapiláře, provedení testů značení a vizualizaci buněk *Calceinem AM*. Také je v praktické části popsán laboratorní experiment, který spočívá v kultivaci adherentní vrstvy buněk v podmínkách trvalého průtoku s využitím mikrofluidního systému. Buněčná vrstva byla v průběhu experimentu snímána konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem *Leica TCS SP8 X*. Za účelem zpracování a analýzy mikroskopických snímků byl vytvořen algoritmus v programovém prostředí MATLAB. V praktické části jsou uvedeny použité chemikálie, látky a přístrojové vybavení nezbytné pro provedení práce. K testům značení a vizualizaci buněk *Calceinem AM* byla využita buněčná linie HUVEC (**H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells). Za účelem praktického seznámení se s jednotlivými kultivačními postupy a testování navrženého kultivačního systému byla použita buněčná linie HEK293 (**H**uman **E**mbryonic **K**idney).

4.1 Použité materiály a přístroje

Použitý materiál:

- Kultivační médium EGM-2 (Lonza)
- Buněčná linie HUVEC
- Kultivační médium EMEM (Sigma-Aldrich)
- Buněčná linie HEK293
- Kultivační médium DMEM (Sigma-Aldrich)
- Buněčná linie 3T3
- Fosfátový pufr PBS (Sigma-Aldrich)
- Trypsin (EDTA) 0,05 % (Gibco)
- Etanol 73 % (Penta)
- Fibronektin z bovinní plazmy (Invitrogen)
- Chlorid sodný 0,9 % (Braun)
- *Calcein AM* (AnaSpec)
- PDMS-Sylgard 184 (Dow Corning)
- Parafilm

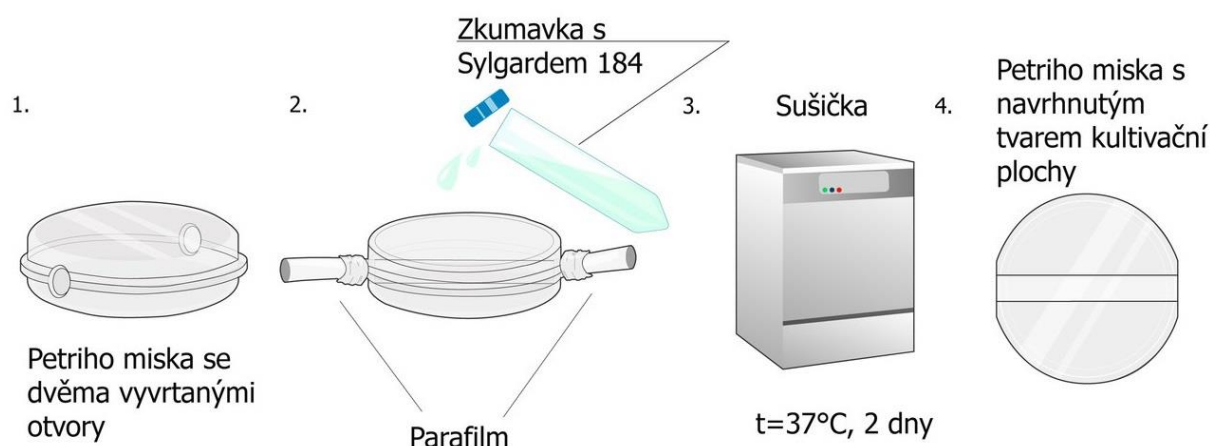
Přístrojové vybavení:

- Fluorescenční inverzní mikroskop Olympus IX-71
- Laminární sterilní box třídy 100 (BioAir)
- Inkubátor (Mettler)
- Vodní lázeň (Mettler)
- Centrifuga (BioTech)
- Kultivační destičky (Sigma-Aldrich)
- Kultivační misky s plochou 9,2 cm² (TPP)
- Konfokální laserový skenovací mikroskop *Leica TCS SP8 X*
- Sušička Incucell (BMT)
- Laboratorní peristaltická pumpa Dynamax (Rainin)

4.2 Příprava mikrokapiláry v Petriho misce

Pro přípravu mikrokapiláry, ve které byla buněčná vrstva následně kultivována, byl zvolen chemický silikon, PDMS (Sylgard 184). PDMS je ideální volbou pro výrobu *in vitro* modelu kvůli jeho unikátním vlastnostem. V první řadě má vysokou plynovou propustnost, což zajišťuje dostatečné zásobování, kultivované vrstvy buněk, kyslíkem. Druhou výhodou PDMS jsou jeho dobré optické vlastnosti, zejména průhlednost, která dovoluje sledování buněčné vrstvy v reálném čase. Kromě toho je PDMS flexibilní materiál, což je výhodou pro snadnou výrobu modelů kultivace buněčné vrstvy. [39]

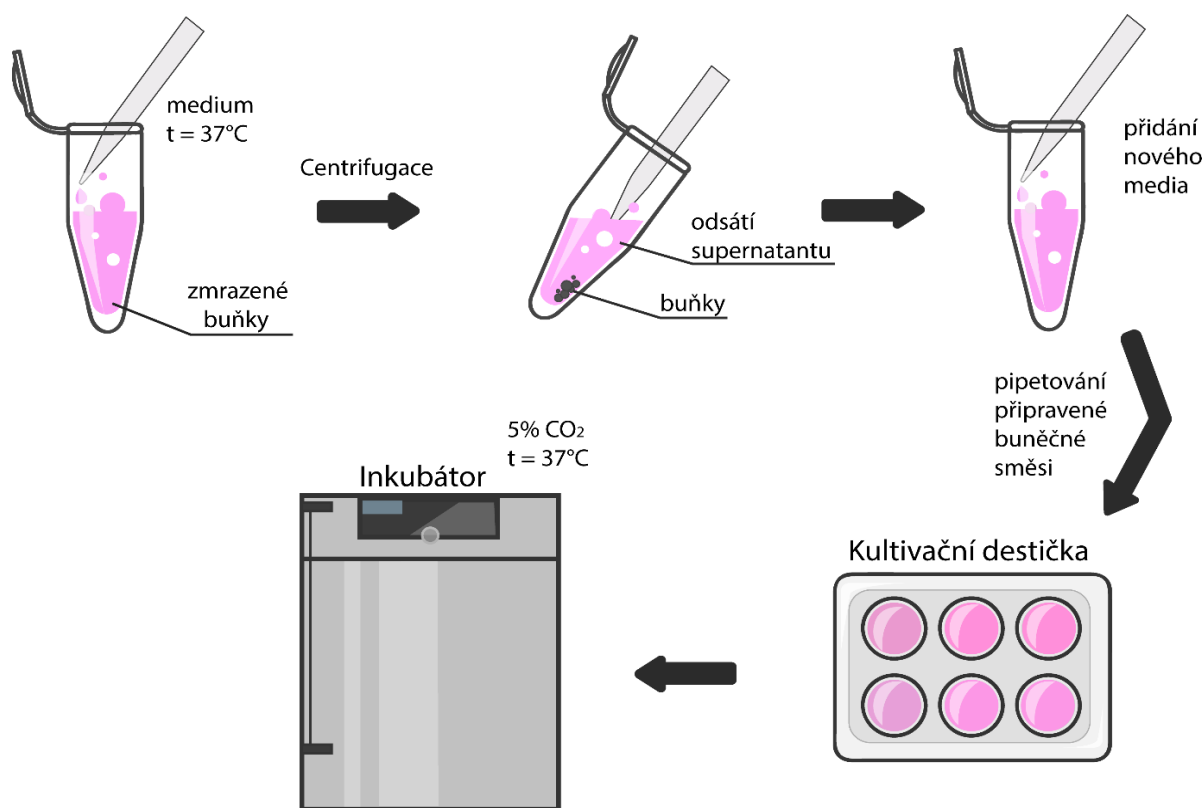
Na začátku byla připravena Petriho miska (s plochou $9,2\text{ cm}^2$) se dvěma vyvrtanými otvory na bočních stranách (viz Obrázek 16, krok 1). Dále byla dovnitř misky vložena trubička o průměru 4 mm, která byla u otvorů na vnější straně misky fixována parafilmem, aby se předešlo prosáknutí směsi (viz Obrázek 16, krok 2). Sylgard 184 se skládá ze dvou složek, které byly smíchány v objemovém poměru 10:1. Takto připravená směs Sylgardu 184 byla nalita do Petriho misky s vloženou trubičkou a následně vložena do sušičky o teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Poté je vytažena ze sušičky a dosušena při pokojové teplotě po stejně dlouhou dobu (viz Obrázek 16, krok 3). Po ztuhnutí směsi byla trubička odstraněna a takto připravená mikrokapilára (viz Obrázek 16, krok 4) byla dezinfikována etanolem a následně UV světlem.



Obrázek 16: Schéma postupu přípravy mikrokapiláry v Petriho misce.

4.3 Rozmrazení buněk

Prvním krokem při práci s buněčnými kulturami je jejich rozmrazování. Rozmrazování buněk probíhá následujícím způsobem: kryozkumavka se zamrazenými buňkami se přemísťuje do vyhřáté vodní lázně, následně se do kryozkumavky přidává kultivační médium o teplotě 37 °C. Dál je buněčná suspenze centrifugována po dobu 3 minut a následně je z ní odstraněn supernatant. Poté jsou buňky resuspendovány v kultivačním médiu a takto připravená buněčná vhodně koncentrovaná směs je pipetována do kultivačních jamek. Nakonec je kultivační destička přesunuta do inkubátoru, který zajišťuje nezbytné podmínky pro existenci buněk. Atmosféra v inkubátoru je obohacena o 5 % CO₂ a její teplota je udržována na 37 °C. Jednotlivé kroky rozmrazování jsou znázorněny na obrázku (viz Obrázek 17).

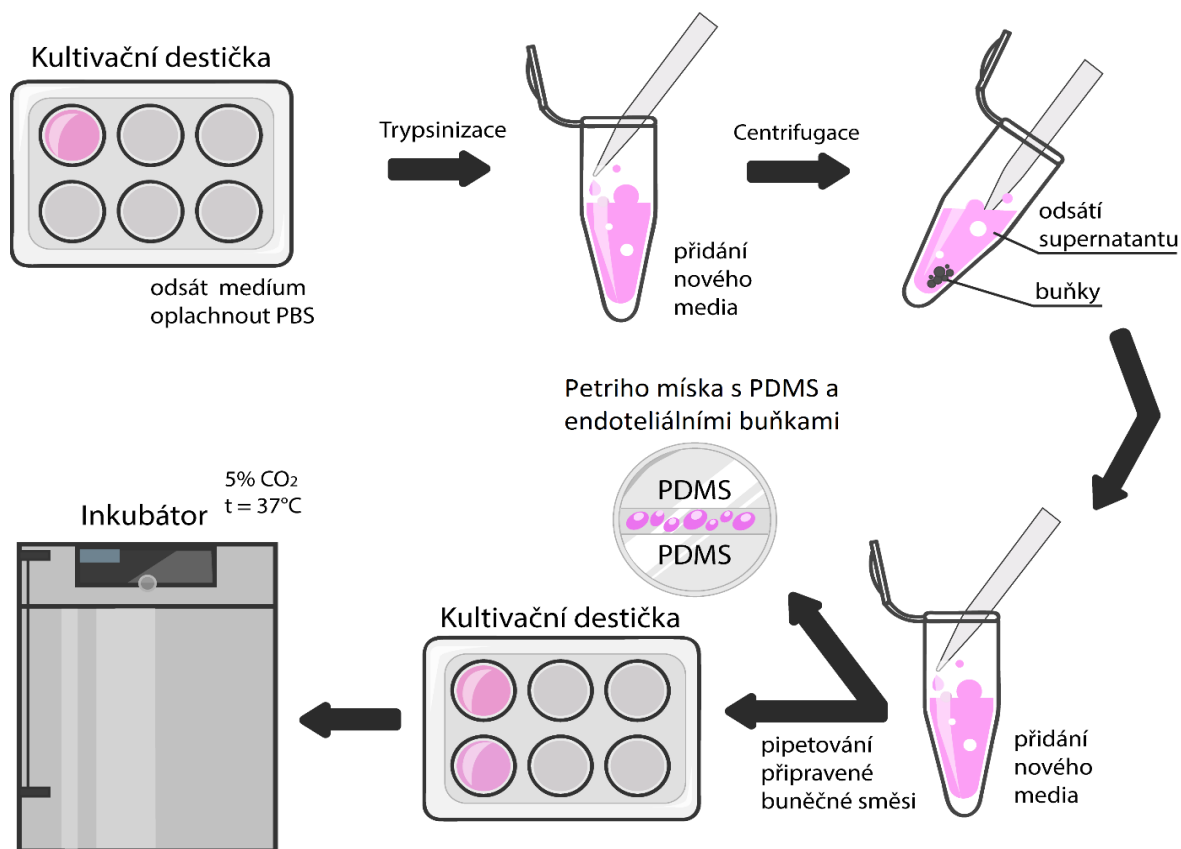


Obrázek 17: Postup rozmrazení buněk.

4.4 Pasážování buněk

Kultivační médium je zapotřebí vyměnit za 24 hodiny po nasazení buněk a pak jednou za dva dny. Po dosažení 80-90 % konfluence je nutné provést pasáž buněk, aby nedošlo

k prostorové inhibici dělení. Při práci s buňkami je důležité dbát na sterilitu prostředí, aby předešlo kontaminaci buněk. Z toho důvodu probíhalo pasážování v čistých prostorech a s buňkami se manipulovalo v laminárním boxu. Proces pasážování buněk je zobrazen na obrázku (viz Obrázek 18).



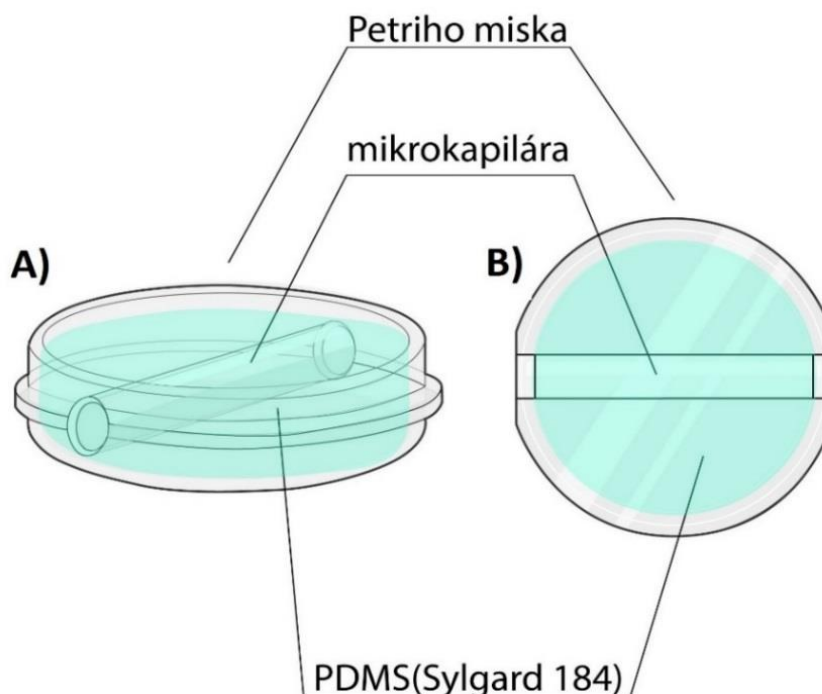
Obrázek 18: Postup pasážování buněk.

Protokol pasážování pro jednu jamku 24-jamkové kultivační destičky vypadá následovně:

1. Vyjmout kultivační destičku z inkubátoru a zkontrolovat stav buněk pod mikroskopem.
2. Odpipetovat 500 μ l média z kultivační jamky.
3. Po odsátí média dvakrát promýt PBS pro odstranění zbytků starého média.
4. Přidat 200 μ l trypsinu, aby se buňky odlepili od kultivačního povrchu, a nechat působit po dobu 3 minut v inkubátoru.
5. Vyjmout kultivační destičku z inkubátoru a zkontrolovat buňky pod mikroskopem.

6. Ve stádiu kdy jsou buňky uvolněny z kultivačního povrchu, přidat 750 μ l kultivačního média, aby se zastavil proces trypsinizace, který může poškodit buněčnou membránu.
7. Přelit buněčnou suspenzi do eppendorfovy zkumavky a centrifugovat po dobu 3 minut rychlostí rotoru centrifugy 1500 RPM.
8. Odsát z eppendorfovy zkumavky supernatant, přidat 1 ml nového média a resuspendovat.
9. Do každé kultivační jamky přidat určité množství kultivačního média a určité množství buněčné suspenze.

Po ukončení procesu pasážování bylo přidáno 200 μ l buněčné suspenze, která byla naředěna 200 μ l kultivačního média, do Petriho misky s navrhnutým tvarem kultivační plochy, výroba je blíže popsána (viz kapitola 3.2). Povrch mikrokapiláry byl předem potáhnut fibronectinem za účelem zlepšení adheze buněčné vrstvy. Kultivační plocha byla vymezena pomocí polymeru PDMS. Návrh upravené Petriho misky byl konzultován s vedoucím bakalářské práce (viz Obrázek 19). Buňky byly po nasázení do mikrokapiláry ponechány v inkubátoru 24 hodin předtím, než byla mikrokapilára připojena k mikrofluidnímu systému (viz kapitola 4.7).



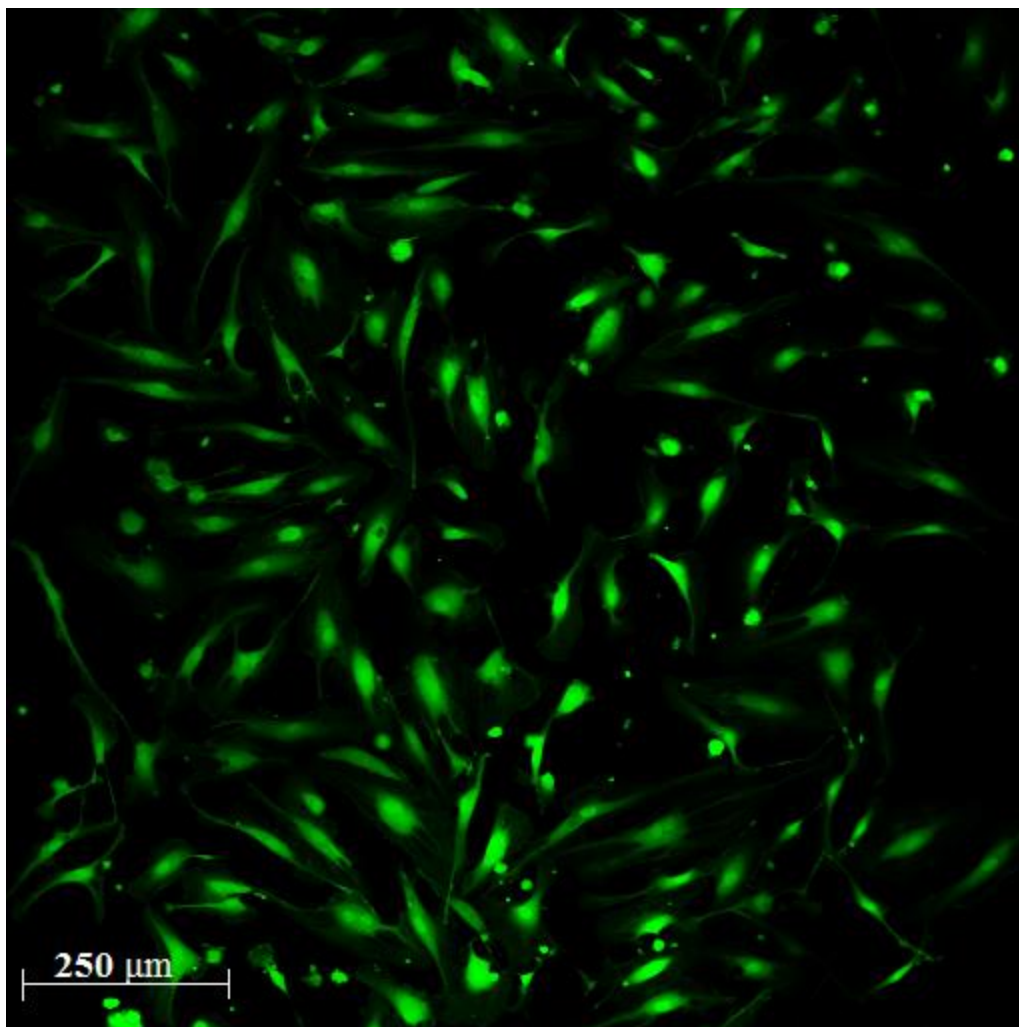
Obrázek 19: Petriho miska s navrhnutým tvarem kultivační plochy, A) vzhled z boku, B) vzhled shora.

4.5 Testy značení a vizualizaci buněk

Při práci s buňkami je důležitým sledovaným parametrem viabilita buněk. Stanovení životaschopnosti buněk je založeno na detekci přítomnosti intracelulární enzymové aktivity, která je sledována pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Za účelem krátkodobého označení a detekce viability buněk, byla zvolena fluorescenční sonda *Calcein AM*. *Calcein AM* snadně proniká přes membránu a dobře se udržuje v živých buňkách, kde chemický se proměňuje pod vlivem esteráz a začíná vyzařovat intenzivní světlo zelené barvy o vlnové délce 515 nm. V případě mrtvé buňky, která má narušenou membránovou integritu, se barvivo nezadržuje v intracelulárním prostředí a buňka zůstává neoznačená. [40]

Před začátkem experimentu musí být *Calcein AM* vyjmut z ledničky a ohřát na pokojovou teplotu. *Calcein AM* je zředěn v kultivačním médiu na výslednou koncentraci 0,008 mmol a následně injektován do média v kultivační misce s endoteliálními buňkami. Po označení buněk roztokem *Calceinu AM* je vhodné médium odsát a nakápnout médium čerstvé, poté nechat misku s označenými buňkami v inkubátoru po dobu 20 minut. [40]

Pro sledování označených buněk (buněčné linie HUVEC) byl využit LSCM *Leica TCS SP8 X*, který je umístěn na antivibračním stole. Excitační vlnová délka pro *Calcein* byla nastavena na 490 nm a emisní v rozsahu 500 – 560 nm. Pro každý mikroskopický snímek byl pomocí mikroskopu získán určitý počet řezů o rozměrech 1,16 x 1,16 mm. Překrytím získaných řezů v softwaru MATLAB je složen každý výsledný obraz. Příklad mikroskopického snímku endoteliální buněčné vrstvy označené *Calceinem AM*, složeného z 20 řezů, je na obrázku (viz Obrázek 20). Celkem byly získány mikroskopické snímky třech různých vzorků endoteliální buněčné vrstvy s odlišnou konfluencí, které byly dále použity pro testování algoritmu vytvořeného v programovém prostředí MATLAB (viz kapitola 4.8).

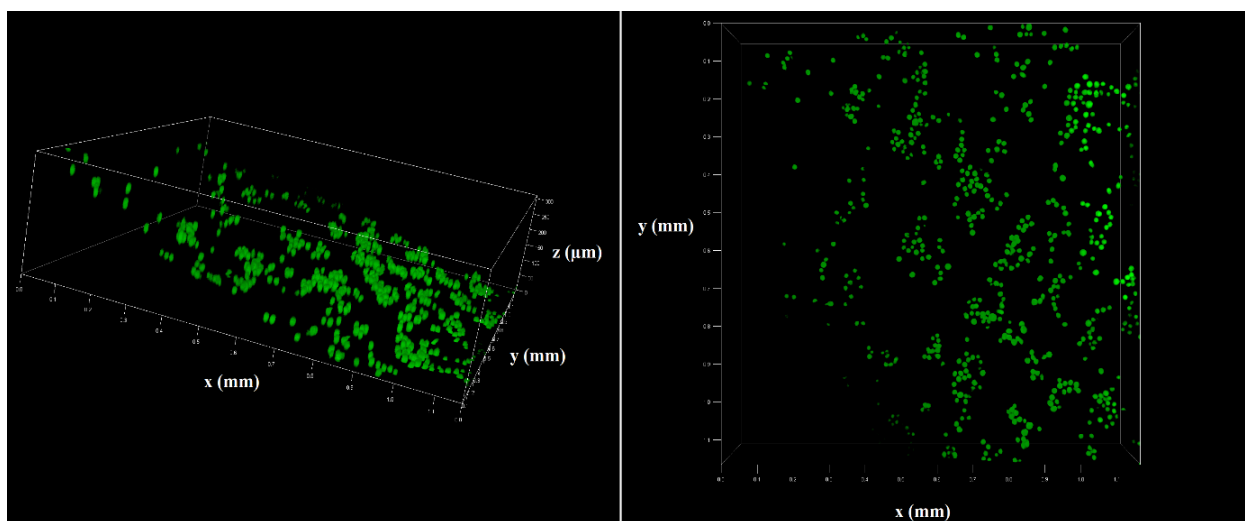


Obrázek 20: Vysledný mikroskopický snímek. Buněčná linie HUVEC. Zvětšení objektivu 10x. Celkem bylo získáno 20 řezů, vzdálenost mezi kterými je 0,3 μm . Tloušťka vzorku 5,7 μm .

4.6 Testování optických vlastností mikrokapiláry

Vhodně zvolený *in vitro* model je důležitým předpokladem pro správný průběh experimentu a jeho následné vyhodnocení. Avšak vyhodnocení experimentu není možné v případě, že model neumožňuje získání mikroskopických snímků. Z toho důvodu je před zahájením experimentu, během kterého bude buněčná vrstva sledována konfokálním mikroskopem, potřeba otestovat optické vlastnosti připravené mikrokapiláry (viz kapitola 4.2). Za tímto účelem byla do mikrokapiláry aplikována suspenze buněčné linie 3T3 (fibroblasty), která byla označena fluorescenční sondou *Calceinem AM*. Pro sledování označených buněk byl využit LSCM *Leica TCS SP8 X*. Excitační vlnová délka pro *Calcein AM* byla nastavena na 490 nm a emisní v rozsahu 500 – 560 nm. Pomocí mikroskopu bylo získáno 618 řezů o rozměrech 1,16 x 1,16 mm a vzdáleností mezi jednotlivými řezy 0,5 μm ,

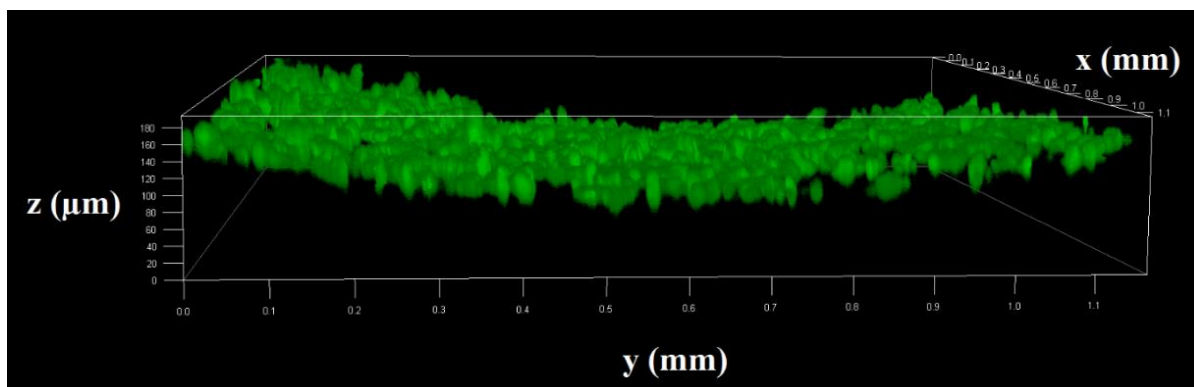
tloušťka vzorku je 308,92 μm . Výsledek byl uspokojivý, tloušťka *in vitro* modelu je vhodná pro zaostření objektivu mikroskopu na vzorek. Vhodnost tloušťky modelu je dokázána tím, že ve výsledném 3D snímku (viz Obrázek 21) lze rozeznat jednotlivé buňky. Z toho vyplývá, že navržená mikrokapilára má dobré optické vlastnosti a je vhodná pro naplánovaný experiment v mikrofluidním systému.



Obrázek 21: Výsledné 3D snímky fibroblastů označených *Calceinem AM*. Zvětšení objektivu 10x.

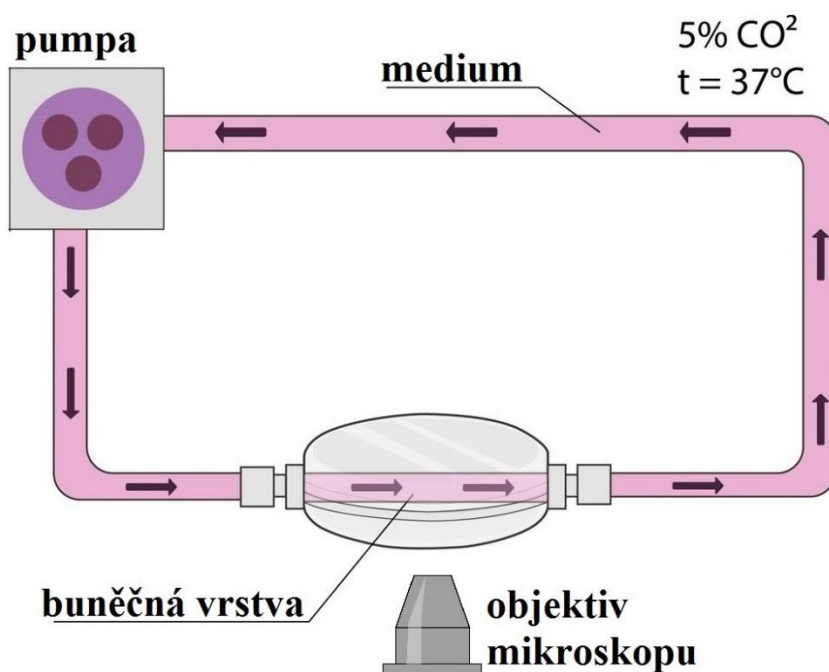
4.7 Kultivace buněčné vrstvy v podmínkách trvalého průtoku

Po uplynutí 24 hodin po nasázení buněčné linie HEK293 do mikrokapiláry (viz kapitola 4.4) byla provedena kultivace buněčné vrstvy v podmínkách trvalého průtoku. Za účelem kontroly byla buněčná vrstva označena *Calceinem AM* a nasnímána pomocí LSCM *Leica TCS SP8 X* před zahájením experimentu. Celkem bylo získáno 388 řezů o rozměrech 1,16 x 1,16 mm, vzdálenost mezi jednotlivými řezy je 0,5 μm , tloušťka vzorku je 193,588 μm . Na pořízeném 3D snímku lze rozpoznat buňky, které adherovaly na povrchu mikrokapiláry kulatého tvaru (viz Obrázek 22). Excitační vlnová délka pro *Calcein AM* byla nastavena na 490 nm a emisní na 500 – 560 nm.

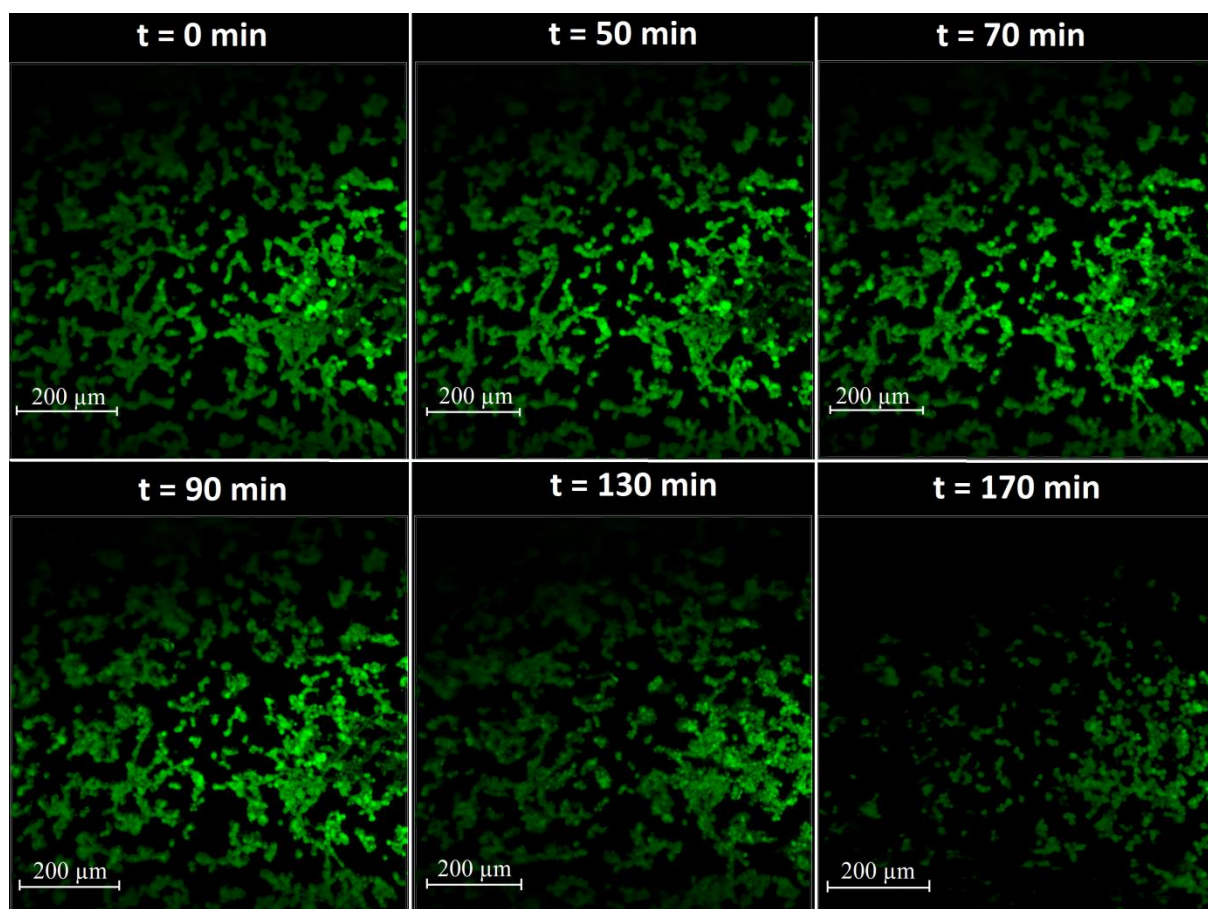


Obrázek 22: 3D snímek buněčné vrstvy označené *Calceinem AM* uvnitř mikrokapiláry před zahájením experimentu. Zvětšení objektivu 10x.

Jako zdroj proudění v mikrofluidním systému byla použita laboratorní peristaltická pumpa typu Dynamax od firmy Rainin, která pracuje na principu střídání fáze stlačení a uvolnění hadičky s roztokem. Pumpa umožňuje nastavení rychlosti rotoru od 0 do 48 RPM. Před zahájením experimentu je potřeba propláchnout hadičky pumpy etanolem a následně destilovanou vodou, aby byly odstraněny nečistoty, které mohou poškodit buněčnou vrstvu. Poté se hadičky naplní kultivačním médiem o teplotě 37 °C, které bude proudit mikrokapilárou. Spojení mezi hadičkami a mikrokapilárou je realizováno pomocí speciálních přípojek, přičemž je důležité, aby se do hadiček nedostaly bubliny vzduchu. Mikrokapilára připojená k pumpě je dále fixována na pracovním stolku v boxu konfokálního mikroskopu, kde jsou dodržovány podmínky nezbytné pro existenci buněk. Důležitá je zejména teplota 37 °C a obohacení atmosféry o 5 % CO₂. Posledním krokem je zapnutí pumpy a nastavení rychlosti proudění média z pumpy na 0,5 RPM, čímž je zahájen experiment. Návrh průběhu připravovaného experimentu je vyobrazen na schématu (viz Obrázek 23). Buněčná vrstva byla sledována LSCM *Leica TCS SP8 X* po celou dobu experimentu, který trval 170 minut. Excitační vlnová délka pro *Calcein AM* byla nastavena na 490 nm a emisní vlnová délka byla v rozsahu 500 – 560 nm. Pro každý mikroskopický snímek bylo získáno 50 řezů o rozměrech 1,16 x 1,16 mm, vzdálenost mezi jednotlivými řezy je 0,5 μm, tloušťka vzorků je 24 μm (viz Obrázek 24). Navržený mikrofluidní systém tím byl otestován na buněčné línii HEK293 a prokázal se jako vhodný pro experiment s buněčnou linií HUVEC.



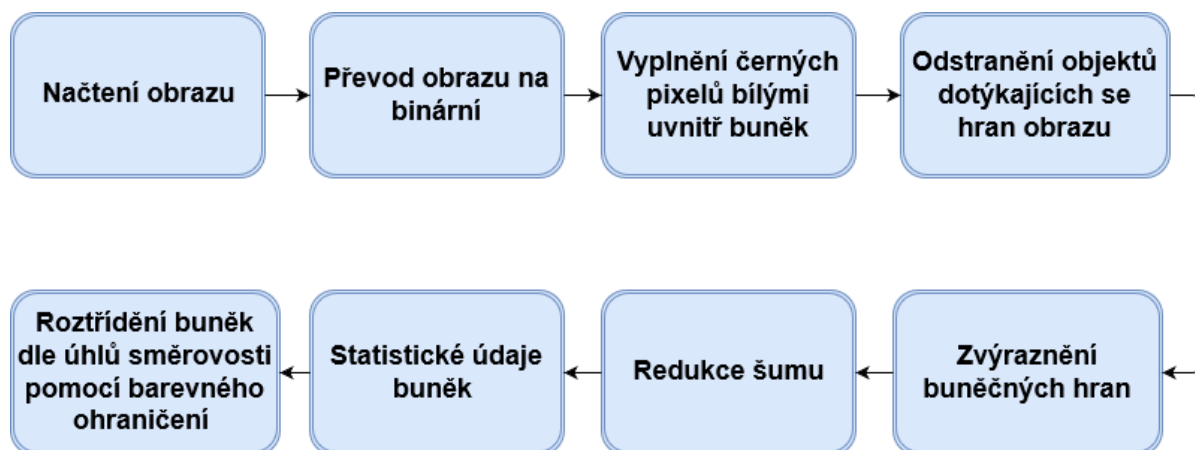
Obrázek 23: Schematické znázornění zapojení experimentu.



Obrázek 24: Mikroskopické 3D snímky buněčné vrstvy (buněčná linie HEK293), pořízené v průběhu experimentu. Zvětšení objektivu 10x.

4.8 Zpracování a analýza získaných mikroskopických snímků

Za účelem jednodušší analýzy nasnímaných obrazů endoteliální vrstvy buněk byl navržen algoritmus v programovém prostředí MATLAB (verze R2016b), jehož názorné schéma je na obrázku (viz Obrázek 25). Algoritmus byl vytvořen pro zpracování snímku počátečního stavu buněk, pořízeného před zahájením experimentu, a snímku získaného po určité době od připojení mikrokapiláry k pumpě.

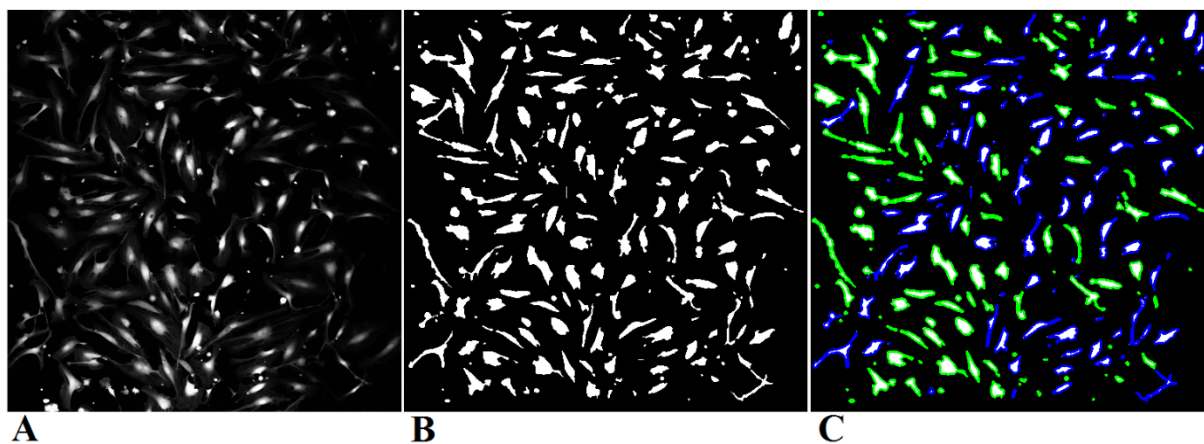


Obrázek 25: Postup při zpracování nasnímaných obrazů dle navrženého algoritmu v programovém prostředí MATLAB.

Nejprve se načte určitý obraz, který je následně převeden na binární s využitím vhodného prahu pomocí funkce *imbinarize*. Poté jsou vyplněny prázdné prostory, tak že uvnitř buněk, které jsou složeny z bílých pixelů, jsou černé pixely nahrazeny bílými pixely pomocí funkce *imfill*. Objekty dotýkající se okrajů snímku jsou odstraněny funkcí *imclearborder*. Zvýraznění okrajů buněk a současná redukce šumu v okolí buněk je realizována s využitím funkce *activecontour*. Poslední úpravou je odstranění velmi malých objektů o velikosti 6 pixelů a méně z obrazu, pomocí funkce *bwareaopen*. Pro zobrazení výsledků všech výše popsanych operací slouží obrázek (viz Obrázek 26, B).

Jak již bylo zmíněno (viz kapitola 3.2), směrovost a změna tvaru buněk jsou významnými analyzovanými parametry při experimentech s mikrofluidními systémy. Proto algoritmus počítá množství živých buněk a současně získá statistické hodnoty buněk pomocí funkce *regionprops*, zejména se jedná o střední hodnotu směrového úhlu (orientace), délky a šířky všech detekovaných buněk (viz kapitola 5). Následně jsou buňky doplněny o ohrazení v různé barvě dle úhlů směrovosti. Buňky ohrazené zelenou barvou mají úhel směrovosti

v rozmezí od -90° do 0° a buňky ohraničené modrou barvou mají orientaci v rozmezí od 1° do 90° (viz Obrázek 26, C).



Obrázek 26: A) Původní obraz, B) Zpracovaný obraz, C) Rozdělení buněk dle úhlů směrovosti.

5. Diskuze dosažených výsledků

V prvním kroku, před zahájením experimentu s buněčnou kulturou v mikrofluidním systému, bylo potřeba vytvořit průhlednou mikrokapiláru, ve které by mohla být buněčná vrstva kultivovaná. Za tímto účelem byla použita Petriho miska a polymer PDMS, pomocí kterého byla kultivační plocha vymezena. Návrh vytvořené mikrokapiláry byl několikrát poupraven, protože počáteční myšlenka kultivace buněčné vrstvy přímo na dně Petriho misky vykazovala své nedostatky, zejména se jednalo o prosáknutí buněčné suspenze pod formu z PDMS. Buněčná vrstva byla nakonec kultivována na povrchu mikrokapiláry z PDMS, avšak buňky neprokázaly schopnost adherovat na povrchu polymeru. Proto byl povrch mikrokapiláry napřed potažen vhodnou látkou, fibronectinem, za účelem zlepšení adheze buněčné vrstvy a po této povrchové úpravě již buňky snadno adherovaly na povrchu mikrokapiláry.

Vytvořená *in vitro* model byl otestován pomocí buněčné linie 3T3, která byla snímána LSCM *Leica TCS SP8 X*, a prokázal dobré optické vlastnosti s drobným nedostatkem. Ve spodní části kapiláry, uvnitř *in vitro* modelu, se objevily mikropraskliny po odstranění trubičky (viz kapitola 4.2). Mikropraskliny mírně snížily kvalitu pořízených mikroskopických snímků.

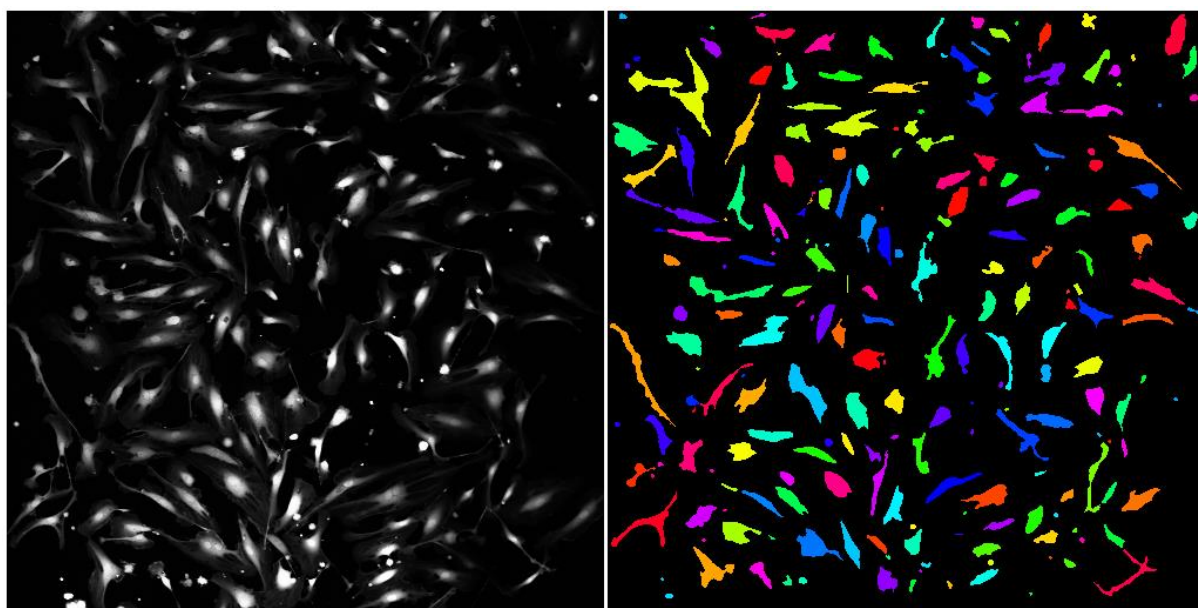
Vzhledem k náročnosti kultivace buněčné linie HUVEC byl navržený experiment na začátku otestován na buněčné linii HEK293, protože dané buňky jsou méně citlivé na kultivační podmínky. Mikroskopické snímky buněčné vrstvy, pořízené za začátku experimentu a po určitých časových intervalech, prokázaly, že buněčná vrstva může být dlouhodobě sledována v podmínkách trvalého průtoku. Avšak intenzita *Calceinu AM*, kterým byly buňky označeny, začala klesat po dvou hodinách. Proto se *Calcein AM* neosvědčil jako vhodné barvivo pro dlouhodobou analýzu. Tento problém je možné vyřešit dvěma způsoby: v případě dlouhodobé analýzy je potřeba postupně zvyšovat intenzitu laseru konfokálního mikroskopu po každých 120 minutách nebo zmenšit celkovou dobu experimentu na cca 120 minut. Po vyřešení tohoto nedostatku, jedním z předložených způsobů, může být systém otestován i na buněčné linii HUVEC, která ovšem už nebyla v té době k dispozici.

Pro zpracování mikroskopických snímků endoteliální buněčné vrstvy, pro kterou byla plánována kultivace v podmínkách trvalého průtoku, byl vytvořen algoritmus v programovém prostředí MATLAB (verze R2016b). Algoritmus měl být otestován na snímku počátečního stavu buněk, pořízeného před zahájením experimentu, a snímku získaného po určité době od připojení mikrokapiláry k pumpě. Jak už bylo zmíněno, buněčná linie HUVEC nebyla k dispozici v době, kdy byl mikrofluidní systém již připraven a otestován. Z toho důvodu byl algoritmus otestován pouze na třech snímcích, *Calceinem AM* označené endoteliální vrstvy, která byla kultivována bez proudových podmínek. Předložený algoritmus počítá množství živých buněk na snímku, střední hodnotu směrového úhlu (orientace), délky a šířky všech detekovaných buněk (viz Tabulka 1). Hodnoty v tabulce jsou zaokrouhlené. Celkový počet detekovaných buněk na prvním snímku se výrazně liší od počtu buněk na dalších snímcích kvůli tomu, že ke snímání byly použity vzorky s odlišnou konfluencí. Porovnáním těchto parametrů by bylo možné zhodnotit přežívání buněk a dlouhodobou retenci v navržené mikrokapiláře a následně posoudit, jestli endoteliální buňky změnily svůj tvar a velikost na rozdíl od jejich stavu na začátku experimentu v mikrofluidním systému.

Buňky linie HEK293 mají odlišný tvar a velikost než buňky linie HUVEC, a proto byly změny, vyvolané proudící tekutinou, na snímcích nepatrné (viz kapitola 4.7, Obrázek 24). Z toho důvodu nebylo možné zhodnotit změny jejích tvarů v mikrofluidním systému, pomocí algoritmu navrženého pro buňky linie HUVEC. K vizuálnímu posouzení kvality úpravy obrazu pomocí navrženého algoritmu, pomáhá srovnávací obrázek (viz Obrázek 27), na kterém je vyobrazen původní obraz a obraz po zpracování, kde je každá buňka označena náhodnou barvou. Pomocí daného obrázku je možné posoudit, jestli algoritmus správně detekoval jednotlivé buňky. Srovnávací obrázek pomáhá k výběru správného prahu, morfologického operátoru nebo počtu opakování některé operace pro získání přesnějších výsledků.

Tabulka 1. Statistické údaje buněk získané pomocí navrženého algoritmu

Název obrázku	Celkový počet buněk	Střední hodnota orientace (stupně, od -90° do 90°)	Střední hodnota délky (milimetry)	Střední hodnota šířky (milimetry)
test_1	224	2,58	6,05	2,27
test_2	682	-0,03	3,54	1,73
test_3	746	-1,66	3,33	1,68



Obrázek 27: Původní obraz (nalevo), upravený obraz s barevně zvýrazněnými buňkami (napravo).

Závěr

Cílem této bakalářské práce byla kultivace buněčné vrstvy v mikrofluidním systému. Bakalářská práce je, za účelem bližšího seznámení se s problematikou tématu, rozdělena na dvě základní části: teoretickou a praktickou část. Cílem teoretické části bylo poskytnout základ k vypracování části praktické, zejména popsat princip *in vitro* kultivace buněčných kultur a některá již otestovaná kultivační zařízení, která byla použita v experimentech s endoteliálními buňkami v mikrofluidních systémech. V teoretické části práce byly uvedeny některé algoritmy a softwarové nástroje pro automatickou analýzu a zpracování mikroskopických snímků pořízených při experimentech s mikrofluidními systémy. Z důvodu, že byl v praktické části ke snímání buněčné vrstvy použit LSCM *Leica TCS SP8 X*, jsou v teoretické části práce poskytnuty základní informace o mikroskopických technikách a jejich principech.

Hlavním cílem praktické části bylo osvojit si postupy v laboratoři při práci s buněčnými kulturami, včetně testu značení a vizualizace buněk, provést kultivaci buněčné vrstvy uvnitř navržené mikrokapiláry v podmínkách trvalého průtoku, zhodnotit přežívání buněk a dlouhodobou retenci v daném tvaru. Navržený experimentální systém byl otestován na buněčné linii HEK293. Systém je složen ze tří základních částí, kterými jsou *in vitro* model pro kultivaci buněčné vrstvy (Petriho miska s mikrokapilárou uvnitř), zdroj proudění (laboratorní peristaltická pumpa) a konfokální mikroskop ke sledování buněčné vrstvy v reálném čase (LSCM *Leica TCS SP8 X*). Získané výsledky (viz kapitola 4.7) prokázaly, že systém je vhodný pro krátkodobé sledování změn buněčné vrstvy, které vznikají vlivem proudění. V tuto chvíli je navržený systém připraven k testování s buněčnou linií HUVEC a k analýze mikroskopických snímků endoteliální buněčné vrstvy je připraven algoritmus, jenž byl vytvořen v programovém prostředí MATLAB (viz kapitola 4.8).

Algoritmus vytvořený v programovém prostředí MATLAB (verze R2016b) byl otestován na třech snímcích endoteliální buněčné vrstvy, kultivované za standardních podmínek, označené *Calceinem AM*. Předpokládá se, že algoritmus bude vhodný i ke zpracování a analýze snímku endoteliální buněčné vrstvy kultivované za proudových podmínek, avšak může nastat potřeba úpravy některých parametrů. Endoteliální buňky kultivované za proudových podmínek, vnímají smykové napětí („shear stress“), které na

jejich povrchu způsobuje proudící médium. Proto se předpokládá, že během experimentu smykové napětí zapříčiní prodlužování a změnu orientace endoteliálních buněk ve směru proudění. Na základě tohoto předpokladu je vytvořený algoritmus zaměřen na vypočítání nejdůležitějších parametrů pro daný experiment: celkový počet živých buněk, střední hodnoty směrového úhlu, délky a šířky všech detekovaných buněk na snímku. Porovnáním hodnot získaných pomocí algoritmu bude možné posoudit, jestli endoteliální buňky přežily stimulaci proudící tekutinou a projevíly schopnost k adaptaci na změnu kultivačních podmínek. [1]

Seznam literatury

- [1] ŠVIHÁLKOVÁ ŠINDLEROVÁ, Lenka a Ondřej VAŠÍČEK. Mikrofluidní systémy pro kultivaci buněk v podmínkách proudového stresu: Skriptum metodických materiálů [online]. [cit. 2016-12-23]. Dostupné z: http://organonet.med.muni.cz/media/62768/vy_10.pdf
- [2] BÁRTOVÁ, Eva. Biologie a genetika pro bakaláře. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat: Buněčné a tkáňové kultury [online]. [cit. 2016-10-26]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz
- [3] VEJRAŽKA, Martin. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze: Buněčné kultury [online]. [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [4] BALDUCCI, Luigi, Antonella BLASI, Marilisa SILDARELLI, et al. Immortalization of human adipose-derived stromal cells: production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors. Stem Cell Research & Therapy [online]. 2014, 5(3), 63- [cit. 2017-01-01]. DOI: 10.1186/scrt452. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <http://stemcellres.com/content/5/3/63>
- [5] BOUÏS, Diane, Geke A.P. HOSPERS, Coby MEIJER, Grietje MOLEMA a Nanno H. MULDER. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research [online]. 4(2),91-102 [cit. 2017-01-01]. DOI:10.1023/A:1012259529167. ISSN 09696970. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1012259529167>
- [6] FRESHNEY, R. Ian. Animal cell culture: a practical approach. 2nd ed. New York: IRL Press at Oxford University Press, c1992. ISBN 01-996-3213-8.
- [7] Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 2nd Edition. SigmaAldrich Co. 2001 [online]. 15. 11. 2016 [cit. 2016-11-15]. Dostupné z: <http://www.bristol.ac.uk/safety/media/gn/ecacc-handbook-gn.pdf>

- [8] FÉLÉTOU, Michel. The endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael, Calif: Morgan, 2011. ISBN 978-161-5041-244. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57149/>
- [9] KARETOVÁ, Debora. CSc. II. interní klinika VFN a 1. LF UK Praha: VÝZNAM ENDOTELU PRO ROZVOJ KARDIOVASKULÁRNÍCH CHOROB [online]. [cit. 2016-11-15]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2002/03/06.pdf>
- [10] Promo Cell: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) [online]. [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <http://www.promocell.com/products/human-primary-cells/endothelial-cells-large-vessels/human-umbilical-vein-endothelial-cells-huvec/>
- [11] PARK, Ho-Jin, Yali ZHANG, Serban P. GEORGESCU, Kristin L. JOHNSON, Dequon KONG a Jonas B. GALPER. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Reviews* [online]. 2006, 2(2), 93-101 [cit. 2017-05-24]. DOI: 10.1007/s12015-006-0015-x. ISSN 15508943. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12015-006-0015-x>
- [12] HEK293 Cell Line [online]. [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <http://www.hek293.com>
- [13] LIN, Yao-Cheng, Morgane BOONE, Leander MEURIS, et al., 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications* [online]. 5(11), 4767. [cit. 2017-05-24] DOI: 10.1038/ncomms5767. ISSN 2041-1723.
- [14] SITTERLEY, George. Sigma-Aldrich: Poly-lysine [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/poly-lysine.html>
- [15] SITTERLEY, George. Sigma-Aldrich: Fibronectin [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/fibronectin.html>
- [16] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-1-4.

- [17] ULLMANN, Vojtěch. Jaderná a radiační fyzika: Ionizující záření. [online]. [cit. 2016-11-18]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika6.htm#InterakceAlfaBeta>
- [18] Mikroskop-Mikroskopy: Fluorescence [online]. [cit. 2016-11-20]. Dostupné z: <http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/>
- [19] FIŠAR, Zdeněk. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH: Fluorofory v biomedicíně. [online]. [cit. 2016-11-18]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [20] LabGuide – Průvodce laboratoří: Fluorochromy [online]. [cit. 2016-12-06]. Dostupné z: <http://labguide.cz/fluorochromy>
- [21] UGGERI, Jacopo, Rita GATTI, Silvana BELLETTI, Renato SCANDROGLIO, Roberto CORRADINI, Bianca Maria ROTOLI a Guido ORLANDINI. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemistry and Cell Biology*. 2000, 122(5), 499-505. DOI: 10.1007/s00418-004-0712-y. ISSN 0948-6143. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-004-0712-y>
- [22] Dojindo Molecular Technologies, Inc. [online]. [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: <http://www.dojindo.com/store/p/137-Cell-Counting-Kit-F.html>
- [23] SPRING, Kenneth a Michael DAVIDSON. Introduction to Fluorescence Microscopy. FLORIDA STATE UNIVERSITY, Nikon, Inc. MicroscopyU [online]. [cit. 2016-11-20]. Dostupné z <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- [24] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahůše NOVOTNÁ. Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 9788024618807.
- [25] VÁVROVÁ, Jaroslava. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. Principy a základní součásti fluorescenčního mikroskopu [online]. [cit. 2016-11-20]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/JVAUN.htm>
- [26] VESELÁ, Mária. Konfokální laserová rastrovací mikroskopie. [online]. [cit. 2016-11-21]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>

- [27] SEDLÁŘOVÁ, Michaela. Konfokální mikroskopie. Principy konfokální mikroskopie. [online].[cit. 2016-11-22]. Dostupné z:
<http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/principles.php>
- [28] SEMWOGERERE, Denis, WEEKS, Eric R. Confocal Microscopy. Emory University, Atlanta, Georgia, U.S.A [online]. Publikováno v Encyklopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Taylor & Francis (2005).[cit.2016-11-22]. Dostupné z:
<http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks/lab/papers/ebbe05.pdf>
- [29] Konfokální mikroskopy: Leica TCS SP8 X. Pragolab [online]. [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: <http://www.pragolab.cz/opticke-mikroskopy/konfokalni-mikroskopy/leica-tcs-sp8x>
- [30] Confocal microscopes: Leica TCS SP8 X. Leica Mikrosystems [online]. [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/details/product/leica-tcs-sp8-x/>
- [31] Ibidi: cells in focus [online].[cit. 2016-12-23]. Dostupné z:
<http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Channel-Slides/m-Slide-I-Luer-Family>
- [32] ESTRADA, Rosendo, Guruprasad A. GIRIDHARAN, Mai-Dung NGUYEN, Thomas J. ROUSSEL, Mostafa SHAKERI, Vahidreza PARICHEHREH, Sumanth D. PRABHU a Palaniappan SETHU. Endothelial Cell Culture Model for Replication of Physiological Profiles of Pressure, Flow, Stretch, and Shear Stress in Vitro. Analytical Chemistry. 2011, 83(8), 3170-3177. DOI: 10.1021/ac2002998. ISSN 0003-2700. Dostupné také z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac2002998>
- [33] ZERVANTONAKIS, Ioannis K., Chandrasekhar R. KOTHAPALLI, Seok CHUNG, Ryo SUDO a Roger D. KAMM. Microfluidic devices for studying heterotypic cell-cell interactions and tissue specimen cultures under controlled microenvironments. Biomicrofluidics [online]. 2011, 5(1), 013406- [cit. 2017-05-30]. DOI: 10.1063/1.3553237. ISSN 19321058. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082343/>
- [34] DIETERICH, Peter, Maria ODENTHAL-SCHNITTLER, Christof MROWIETZ, Michael KRÄMER, Ludger SASSE, Hans OBERLEITHNER a Hans-J. SCHNITTLER.

Quantitative Morphodynamics of Endothelial Cells within Confluent Cultures in Response to Fluid Shear Stress. *Biophysical Journal*. 2000, 79(3), 1285-1297. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76382-X. ISSN 00063495. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634950076382X>

- [35] SIMMERS, M. B., A. W. PRYOR, B. R. BLACKMAN, Michael KRÄMER, Ludger SASSE, Hans OBERLEITHNER a Hans-J. SCHNITTLER. Arterial shear stress regulates endothelial cell-directed migration, polarity, and morphology in confluent monolayers. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2007, 293(3), H1937-H1946. DOI: 10.1152/ajpheart.00534.2007. ISSN 0363-6135. Dostupné také z: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.00534.2007>
- [36] Molecular Devices: MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://www.moleculardevices.com/systems/metamorph-research-imaging/metamorph-microscopy-automation-and-image-analysis-software>
- [37] Home Page NIH Image: About NIH Image [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://imagej.nih.gov/nih-image/about.html>
- [38] SCHNITTLER, Hans-Joachim, Stefan SCHNEIDER, Hartmann RAIFER, Fei LUO, Peter DIETERICH, Ingo JUST a Klaus AKTORIES. Role of actin filaments in endothelial cell-cell adhesion and membrane stability under fluid shear stress. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2001-8-1, 442(5), 675-687. DOI: 10.1007/s004240100589. ISSN 0031-6768. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s004240100589>
- [39] HUH, Dongeun, Geraldine A. HAMILTON a Donald E. INGBER. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*. 2011, 21(12), 745-754. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.09.005. ISSN 09628924. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892411001954>
- [40] Molecular Probes: Invitrogen detection technologies [online]. [cit. 2016-12-22]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Princip optických přístrojů založených na fluorescenci. Převzato z [18]	7
Obrázek 2: Fluorescenční spektra <i>Calceinu</i> . Převzato z [22]	9
Obrázek 3: Schéma konstrukce fluorescenčního mikroskopu. Převzato z [25]	10
Obrázek 4: Schéma konstrukce konfokálního mikroskopu. Převzato z [26]	11
Obrázek 5: Konfokální laserový skenovací mikroskop <i>Leica TCS SP8 X</i> s kompletním vybavením. Převzato z [29]	13
Obrázek 6: μ -Slide I Luer Family. Převzato z [31]	14
Obrázek 7: Schéma kultivační komory. Převzato z [32]	15
Obrázek 8: Mikroskopické snímky kultivované buněčné kultury HUVEC: A) za normálních podmínek, B) za proudových podmínek. Převzato z [31]	16
Obrázek 9: Model onemocnění. Převzato z [33]	16
Obrázek 10: Schéma algoritmu použitého pro zpracování sady mikroskopických snímků v programovacím prostředí LabVIEW. Získanými parametry buněk jsou: pozice (x, y), velikost plochy, směrovost, perimetr atd., v určitém časovém okamžiku. Převzato z [34]	17
Obrázek 11: Snímky pořízeny mikroskopem s fázovým kontrastem (A) byly zpracovány pomocí algoritmu z Obrázku 10. Výsledné snímky (B) byly použity pro výpočet a porovnání orientace buněk. Převzato z [34]	18
Obrázek 12: Automatické zpracování a analýza obrazu v MetaMorph. 1) Původní snímek, 2) Průběžný snímek, 3) Výsledný snímek zobrazující kontury endoteliálních buněk. Převzato z [35]	19
Obrázek 13: Schéma algoritmu použitého při zpracování a analýze sady mikroskopických snímků.	19
Obrázek 14: Buněčná vrstva před (a) a po zahájení experimentu v mikrofluidním systému (a1). Obrázky b a b1 jsou zpracované snímky v programu NIH Image. Převzato z [38]	20
Obrázek 15: Schéma algoritmu použitého při zpracování a analýze sady mikroskopických snímků.	20
Obrázek 16: Schéma postupu přípravy mikrokapiláry v Petriho misce.	23
Obrázek 17: Postup rozmražení buněk.	24
Obrázek 18: Postup pasážování buněk.	25

Obrázek 19: Petriho miska s navrhnutým tvarem kultivační plochy, A) vzhled z boku, B) vzhled shora. _____	26
Obrázek 20: Výsledný mikroskopický snímek. Buněčná linie HUVEC. Zvětšení objektivu 10x. Celkem bylo získáno 20 řezů, vzdálenost mezi kterými je 0,3 μm . Tloušťka vzorku 5,7 μm . _____	28
Obrázek 21: Výsledné 3D snímky fibroblastů označených <i>Calceinem AM</i> . Zvětšení objektivu 10x. _____	29
Obrázek 22: 3D snímek buněčné vrstvy označené <i>Calceinem AM</i> uvnitř mikrokapiláry před zahájením experimentu. Zvětšení objektivu 10x. _____	30
Obrázek 23: Schematické znázornění zapojení experimentu. _____	31
Obrázek 24: Mikroskopické 3D snímky buněčné vrstvy (buněčná linie HEK293), pořízené v průběhu experimentu. Zvětšení objektivu 10x. _____	31
Obrázek 25: Postup při zpracování nasnímaných obrazů dle navrženého algoritmu v programovém prostředí MATLAB. _____	32
Obrázek 26: A) Původní obraz, B) Zpracovaný obraz, C) Rozdělení buněk dle úhlů směrovosti. _____	33
Obrázek 27: Původní obraz (nalevo), upravený obraz s barevně zvýrazněnými buňkami (napravo). _____	36

Seznam zkratek a pojmů

3D	trojdimenzionální
CXCL 12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
ECCM	E ndothelial C ell C ulture M odel
EGM	E ndothelial C ell G rowth M edium
FITC	fluoresceinizothiokynát
HAEC	H uman A ortic E ndothelial C ells
HEK	H uman E mbryonic K idney
HUVEC	H uman U mbilical V ein E ndothelial C ells
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscope
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
PBS	P hosphate- b uffered s aline
PDMS	polydimethylsiloxane
pH	vodíkový exponent
TRITC	tetramethylrhodminizothiokynát
UV	ultrafialové

Seznam příloh na CD

- A. Elektronická verze bakalářské práce ve formátu PDF
- B. Realizovaný program *slozeni_rezu.m* použitý pro složení získaných řezů do výsledného obrazu
- C. Realizovaný program *algoritmus.m* použitý pro zpracování a analýzu získaných mikroskopických snímků endoteliální vrstvy
- D. 20 řezů (složka *test1*), ze kterých je složen obrázek *test_1* ve formátu TIFF, který byl dále použit k testování algoritmu
- E. Další dva obrázky *test_2* a *test_3* ve formátu TIFF, které byly použity k testování algoritmu